



La tomographie d'émission monophotonique chez le petit animal : application à l'imagerie des récepteurs sérotoninergiques centraux

Noé Dumas

► To cite this version:

Noé Dumas. La tomographie d'émission monophotonique chez le petit animal : application à l'imagerie des récepteurs sérotoninergiques centraux. Sciences pharmaceutiques. 2013. dumas-01069434

HAL Id: dumas-01069434

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01069434>

Submitted on 29 Sep 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SICD1 de Grenoble : **thesebum@ujf-grenoble.fr**

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER
FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE

Année 2013

N°

LA TOMOGRAPHIE D'EMISSION MONOPHOTONIQUE
CHEZ LE PETIT ANIMAL : APPLICATION A L'IMAGERIE
DES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES CENTRAUX

THESE
PRESENTEE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE
DOCTEUR EN PHARMACIE
DIPLÔME D'ETAT

Par **NOE DUMAS**
Né le 14 décembre 1985 à Aubenas (07)

THESE SOUTENUE PUBLIQUEMENT
A LA FACULTE DE PHARMACIE DE GRENOBLE
Le 16 septembre 2013

DEVANT LE JURY COMPOSE DE

Président du jury : M. le Professeur Emmanuel DROUET
Membres : M. le Docteur Yves CHARNAY
M. le Docteur Pascal FENDER
M. le Docteur Philippe MILLET (Directeur de thèse)
M. le Professeur Jean-Philippe VUILLEZ

La Faculté de Pharmacie de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



Doyen de la Faculté : **M. Christophe RIBUOT**
Vice-doyen et Directeur des Etudes : **Mme Delphine ALDEBERT**

Année 2012-2013

ENSEIGNANTS A L'UFR DE PHARMACIE

PROFESSEURS DES UNIVERSITES (n=11)

BAKRI	Aziz	Pharmacie Galénique et Industrielle, Formulation et Procédés Pharmaceutiques (TIMC-IMAG)
BOUMENDJEL	Ahcène	Chimie Organique (D.P.M.)
BURMEISTER	Wim	Biophysique (U.V.H.C.I)
DECOUT	Jean-Luc	Chimie Inorganique (D.P.M.)
DROUET	Christian	Immunologie Médicale (TIMC-IMAG)
DROUET	Emmanuel	Microbiologie (U.V.H.C.I) -
GODIN-RIBUOT	Diane	Physiologie-Pharmacologie (HP2)
LENORMAND	Jean Luc	Ingénierie Cellulaire, Biothérapies (THEREX, TIMC, IMAG)
PEYRIN	Eric	Chimie Analytique (D.P.M.)
RIBUOT	Christophe	Physiologie – Pharmacologie (HP2)
WOUESSIDJEWE	Denis	Pharmacotechnie (D.P.M.)

PROFESSEURS DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=6)

CALOP	Jean	Pharmacie Clinique (TIMC-IMAG, PU-PH)
CORNET	Murielle	Parasitologie – Mycologie Médicale (LAPM, PU-PH)
DANEL	Vincent	Toxicologie (SMUR SAMU / PU-PH)
FAURE	Patrice	Biochimie (HP2/PU-PH)
MOSSUZ	Pascal	Hématologie (PU-PH-THEREX-TIMC)
SEVE	Michel	Biochimie – Biotechnologie (IAB, PU-PH)

PROFESSEUR EMERITE (n=1)

GRILLOT	Renée	Parasitologie – Mycologie Médicale (L.A.P.M)
----------------	-------	--

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES (n=31)

ALDEBERT	Delphine	Parasitologie-Mycologie (L.A.P.M)
BATANDIER	Cécile	Nutrition et Physiologie (L.B.F.A)
BELAIDI-CORSAT	Elise	Pharmacologie Physiologie –(HP2)
BOURGOIN	Sandrine	Biochimie – Biotechnologie (IAB)
BRETON	Jean	Biologie Moléculaire / Biochimie (L.C.I.B – LAN)
BRIANCON-MARJOLLET	Anne	Physiologie Pharmacologie (HP2)
BUDAYOVA SPANO	Monika	Biophysique (I.B.S)

Dernière mise à jour : 23/08/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



CAVAILLES	Pierre	Biologie Cellulaire et génétique (L.A.P.M)
CHOISNARD	Luc	Pharmacotechnie (D.P.M)
DELETRAZ-DELPORTE	Martine	Droit Pharmaceutique (Equipe SIS « Santé, Individu, Société »-EAM 4128)
DEMEILLIERS	Christine	Biochimie (L.B.F.A)
DURMORT-MEUNIER	Claire	Biotechnologies (I.B.S)
GEZE	Annabelle	Pharmacotechnie (D.P.M)
GILLY	Catherine	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
GROSSET	Catherine	Chimie Analytique (D.P.M)
GUIEU	Valérie	Chimie Analytique (D.P.M)
HININGER-FAVIER	Isabelle	Biochimie (L.B.F.A)
JOYEUX-FAURE	Marie	Physiologie - Pharmacologie (HP2)
KHALEF	Nawel	Pharmacie Galénique (TIMC-IMAG)
KRIVOBOK	Serge	Biologie Végétale et Botanique (L.C.B.M)
MOUHAMADOU	Bello	Cryptogamie, Mycologie Générale (L.E.C.A)
MORAND	Jean-Marc	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
MELO DE LIMA	Christelle	Biostatistiques (L.E.C.A)
NICOLLE	Edwige	Chimie Thérapeutique (D.P.M)
PERES	Basile	Pharmacognosie (D.P.M)
PEUCHMAUR	Marine	Chimie Organique (D.P.M.)
RACHIDI	Walid	Biochimie (L.C.I.B)
RAVEL	Anne	Chimie Analytique (D.P.M)
RAVELET	Corinne	Chimie Analytique (D.P.M)
SOUARD	Florence	Pharmacognosie (D.P.M)
TARBOURIECH	Nicolas	Biophysique (U.V.H.C.I.)
VANHAVERBEKE	Cécile	Chimie (D.P.M)
<u>MAITRE DE CONFERENCE DES UNIVERSITES-PRATICIEN HOSPITALIER (n=3)</u>		
ALLENET	Benoit	Pharmacie Clinique (THEMAS TIMC-IMAG/MCU-PH)
BUSSER	Benoit	Pharmacie (MCU-PH-IAB-INSERM)
GERMI	Raphaëlle	Microbiologie (U.V.H.C.I./MCU-PH)
<u>PROFESSEUR CERTIFIE (PRCE) (n=2)</u>		
FITE	Andrée	P.R.C.E
GOUBIER	Laurence	P.R.C.E

UFR de Pharmacie de Grenoble

DOMAINE DE LA MERCI
38706 LA TRONCHE CEDEX – France
TEL : +33 (0)4 75 63 71 00
FAX : +33 (0)4 75 63 71 70



PROFESSEURS ASSOCIES (PAST) (n=4)

BELLET	Béatrice	Pharmacie Clinique
RIEU	Isabelle	Qualitologie (Praticien Attaché – CHU)
TROUILLER	Patrice	Santé Publique (Praticien Hospitalier – CHU)
DON	Martin	Laboratoire TIMC-IMAG

PROFESSEUR AGREGE (PRAG) (n=1)

GAUCHARD	Pierre-Alexis	(D.P.M)
-----------------	---------------	---------

ASSISTANTS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES (AHU) (n=2)

SUEUR	Charlotte	Virologie (U.V.H.C.I)
VAN NOOLEN	Laetitia	Biochimie Toxicologie (HP2-DBTP-BGM)

ATER (n= 6)

DAYDE David	ATER	Parasitologie Mycologie (J.R)
FAVIER Mathieu	ATER	Pharmacologie - Laboratoire HP2 (JR)
HADDAD-AMAMOU Anis	ATER	Laboratoire de Pharmacie Galénique
HENRI Marion	ATER	Physiologie – Laboratoire HP2 (JR)
LEHMANN Sylvia	ATER	Biochimie Biotechnologie (JR)
REGENT-KLOEKNER Myriam	ATER	Biochimie (LECA-UJF)

MONITEUR ET DOCTORANTS CONTRACTUELS (n=9)

CAVAREC	Fanny	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
GRAS	Emmanuelle	(01-10-2010 au 30-09-2013)	Laboratoire HP2 (JR)
LESART	Anne-Cécile	(01-10-2009 au 30-09-2013)	Laboratoire (TIMC-IMAG)
MELAINE	Feriel	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
NASRALLAH	Chady	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2(JR)
THOMAS	Amandine	(01-10-2011 au 30-09-2014)	Laboratoire HP2 (JR)
LECERF-SCHMIDT	Florine	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Pharmacochimie (DPM)
BERTHOIN	Lionel	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire (TIMC-IMAG-THEREX)
MORAND	Jessica	(01-10-2012 au 30-09-2015)	Laboratoire HP2 (JR)

CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CIB : Centre d'Innovation en Biologie
DPM : Département de Pharmacochimie Moléculaire
HP2 : Hypoxie Physiopathologie Respiratoire et Cardiovasculaire
IAB : Institut Albert Bonniot, Centre de Recherche « Oncogenèse et Ontogénèse »
IBS : Institut de Biologie Structurale
LAPM : Laboratoire Adaptation et Pathogénèse des Microorganismes
LBFA : Laboratoire Bioénergétique Fondamentale et Appliquée
LCBM : Laboratoire Chimie et Biologie des Métaux
LCIB : Laboratoire de Chimie Inorganique et Biologie
LECA : Laboratoire d'Ecologie Alpine
LR : Laboratoire des Radio pharmaceutiques
TIMC-IMAG : Laboratoire Technique de l'Imagerie, de la Modélisation et de Cognition
UVHCI : Unit of Virus Host Cell Interactions

Dernière mise à jour : 23/08/2013

Rédacteur : LANTOU FAURE ; Secrétaire doyen Pharmacie

DOMAINE DE LA MERCI – 38706 LA TRONCHE CEDEX – France - TEL : +33 (0)4 75 63 71 00 – FAX : +33 (0)4 75 63 71 70

Remerciements

Je voudrais tout d'abord exprimer toute ma gratitude au Dr Philippe Millet et au Dr Yves Charnay pour m'avoir guidé et soutenu tout au long de ce projet de thèse en neurosciences, qui touchera bientôt à sa fin, et dont une partie des résultats est présentée ici.

Je tiens également à témoigner toute ma reconnaissance au Pr Emmanuel Drouet, pour avoir accepté la présidence du jury, et surtout pour m'avoir encouragé dans la voie de la recherche durant mes études de pharmacie.

Je souhaiterais également remercier le Pr Jean-Philippe Vuillez et le Dr Pascal Fender, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant de faire partie du jury de cette thèse.

Je dois également remercier tous les enseignants de l'UFR de Pharmacie de Grenoble pour les connaissances qu'ils m'ont transmises et enfin, bien évidemment, ma famille et mes amis pour leur soutien inconditionnel.

Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans le soutien du Fond national suisse (fond no. 310030_120369). Je remercie aussi l'équipe de la plate-forme BioPark à Archamps ainsi que l'« Association IFRAD Suisse ».

Avant-propos

Les travaux présentés ici ont été réalisés dans le cadre d'une thèse de doctorat en neurosciences, codirigée par les Docteurs Philippe Millet et Yves Charnay, et débutée en octobre 2010 à l'université de Genève.

Sommaire

Figures	9
Tables.....	10
1. Introduction	13
1.1. Généralités sur le système nerveux central	15
1.1.1. Le niveau cellulaire	16
1.1.2. Le niveau moléculaire.....	18
1.1.3. La barrière hémato-encéphalique	19
1.2. La sérotonine	20
1.2.1. Découverte de la sérotonine	21
1.2.2. Origine et métabolisme de la sérotonine.....	22
1.2.3. Les récepteurs à la sérotonine.....	27
1.2.4. Le Transporteur de la sérotonine	30
1.3. La tomographie d'émission monophotonique	31
1.3.1. La radioactivité	32
1.3.2. Radiochimie	34
1.3.3. Instrumentation TEMP	34
1.4. Quantification par modélisation pharmacocinétique	36
1.4.1. Interaction ligand-récepteur	37
1.4.2. Modélisation in vivo	38
1.5. Intérêts de la TEMP chez le petit animal	42
1.5.1. Imagerie TEMP petit animal et barrière hémato encéphalique	43
1.6. Objectifs de l'étude.....	44
2. Matériel et méthodes	46

2.1.	Animaux	46
2.2.	Produits chimiques	46
2.3.	Radiochimie.....	47
2.3.1.	¹²³ I-p-MPPI	48
2.3.2.	¹²³ I-R91150.....	48
2.3.3.	¹²³ I-SB207710.....	48
2.3.4.	¹²³ I-ADAM	48
2.4.	Autoradiographies <i>ex vivo</i>	49
2.5.	Acquisitions TEMP dynamiques	49
2.6.	Coregistration des données et analyse	50
2.7.	Modélisation de la pharmacocinétique du ¹²³ I-R91150	52
3.	Résultats	53
3.1.	¹²³ I-pMPPI	53
3.2.	¹²³ I-R91150.....	54
3.3.	¹²³ I-SB207710	57
3.4.	¹²³ I-ADAM	59
4.	Discussion	61
4.1.	¹²³ I-pMPPI	61
4.2.	¹²³ I-R91150.....	62
4.3.	¹²³ I-SB207710	65
4.4.	¹²³ I-ADAM	65
5.	Conclusion.....	67
	Références	70
	Résumé	76

Figures

Figure 1 - Anatomie du cerveau humain. _____	16
Figure 2 - Anatomie d'un neurone. _____	17
Figure 3 – Récepteur ionotropique et métabotropique. _____	19
Figure 4 – La barrière hémato-encéphalique. _____	20
Figure 5 - Biosynthèse de la sérotonine. _____	22
Figure 6 – Voies sérotoninergiques centrales. _____	24
Figure 7 - La synapse sérotoninergique. _____	26
Figure 8 - Loi de décroissance radioactive. _____	33
Figure 9 - Exemple de collimateurs utilisé en TEMP. _____	36
Figure 10 - Equilibre ligand récepteur. _____	37
Figure 11 - Exemple de modèle compartimental. _____	39
Figure 12 – Le modèle SRTM. _____	42
Figure 13 – Purification HPLC d'un radiotraceur. _____	47
Figure 14 – Atlas digital du cerveau de rat. _____	50
Figure 15 - Etude de la distribution cérébrale in vivo du ^{123}I -p-MPPI. _____	54
Figure 16 - Etude de la distribution cérébrale in vivo du ^{123}I -R91150. _____	55
Figure 17 - Potentiels de liaison non déplaçables du ^{123}I -R91150 _____	57
Figure 18 - Etude de la distribution cérébrale in vivo du ^{123}I -SB207710. _____	58
Figure 19 – Expérience d'inhibition du métabolisme du ^{123}I -SB207710. _____	58
Figure 20 - Etude de la distribution cérébrale in vivo du ^{123}I -ADAM. _____	59

Tables

<i>Tableau 1 – Les récepteurs sérotoninergiques</i>	<i>27</i>
<i>Tableau 2 – Traceurs à l'étude.</i>	<i>51</i>
<i>Tableau 3 – BP non déplaçables à l'équilibre.</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 4 - Paramètres pharmacocinétiques SRTM du ¹²³I-R91150.</i>	<i>56</i>

Liste des Abréviations

5-HT	5-hydroxytryptamine
5-HIAA	acide 5-hydroxyindolacétique
Acb	noyau accumbens
Am	amygdale
AMP	Adénosine Mono Phosphate
ATP	Adénosine Tri Phosphate
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
Bq	Becquerel
BS	tronc cérébral
Cb	cervelet
CgC	cortex cingulaire
Ci	Curie
CPu	noyau caudé-putamen
Cx	cortex
EC	cortex entorhinal
eV	électronvolt
FC	cortex frontal
GABA	acide gamma amino butyrique
HG	glande de Harder
Hip	hippocampe
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
Hyp	hypothalamus
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique

ISRS	inhibiteur spécifique de recapture de la sérotonine
KO	knockout
MB	mésencéphale
MC	cortex moteur
MDR	multi-drug resistance
MPFC	cortex préfrontal médial
OFC	cortex orbitofrontal
P-gp	glycoprotéine P
Pit	glande pituitaire
ROI	région d'intérêt
SC	cortex somatosensoriel
SERT	transporteur de la sérotonine
SNC	système nerveux central
Spt	septum
TEMP	tomographie par émission monophotonique
TEP	tomographie par émission de positrons
Thal	thalamus
Tu	tubercules olfactifs
WT	type sauvage

1. Introduction

Le cerveau humain est probablement l'un des objets les plus fascinants qui soient si l'on considère la complexité des interactions cellulaires qui le caractérise. Il est pour l'essentiel composé d'une petite variété de cellules nerveuses dont les neurones. Par les contacts en réseaux qu'ils assurent par leurs prolongements (dendrites et axones), ceux-ci assurent la neurotransmission par des activités électriques (mouvements d'ions) et chimiques (neurotransmetteurs). Pourtant, si les pièces de ce puzzle peuvent sembler relativement simples vues ainsi, cet organe est capable de performances à ce point prodigieuses que nous sommes aujourd'hui encore bien loin de les égaler par les machines que nous concevons, et au point que certains d'entre nous sont portés à croire que l'« esprit » ne serait pas un prolongement du corps, mais que nous serions au contraire dotés d'une sorte d'âme immatérielle. En dépit de cette immatérialité depuis longtemps débattue par les philosophes et les psychanalystes, le rôle de la psychiatrie biologique n'en reste pas moins important. Les connaissances concernant le substratum biologique des dysfonctionnements liés à certaines maladies mentales (troubles de l'humeur, schizophrénie, anorexie psychogène...) ne cessent de croître, et notamment grâce aux progrès de l'imagerie médicale.

De nos jours les techniques d'imagerie *in vivo* sont largement utilisées pour mieux comprendre le fonctionnement du cerveau : de ses fonctions végétatives les plus élémentaires, à celles les plus élevées de la pensée consciente. Bien sûr l'imagerie ne permettra jamais de tout expliquer, mais elle permet de disposer de notions sur le fonctionnement cérébral, nous aidant ainsi à en saisir les principes fondamentaux.

Depuis le 19^{ème} siècle, et les études réalisées par Paul Broca sur des patients aphasiques, nous savons que chaque région du cerveau joue un rôle qui lui est plus ou moins spécifique. Jusqu'au 20^{ème} siècle, la recherche en neuroscience cognitive reposait essentiellement sur la

méthode de la dissection des cerveaux, avec des résultats limités. Ceci explique l'importance qu'a pris l'imagerie depuis lors : avec l'apparition du scanner à rayons X dans les années soixante-dix, il devenait possible d'étudier *in vivo* le lien entre la localisation d'une lésion cérébrale (ischémie, tumeur, dilatation ventriculaire,...) et les déficits observés cliniquement.

La fin des années soixante-dix marquait aussi les débuts de l'imagerie nucléaire dans le domaine médical, avec le développement des techniques de tomographie par émission de positron (TEP) et de la tomographie d'émission monophotonique (TEMP, aussi connue sous le nom anglais de SPECT). Ces techniques sont basées sur l'utilisation de traceurs radioactifs et permettent d'obtenir une information sur l'état de fonctionnement du cerveau.

Aujourd'hui l'apparition de scanners TEP et TEMP spécialement conçus pour le petit animal de laboratoire ouvre de nouvelles possibilités pour la recherche. Mais l'exploitation de ce potentiel pour des études en neurosciences passe par l'identification de traceurs efficaces chez le petit animal, et c'est cette quête qui est l'objet du travail présenté ici.

Ce manuscrit comporte d'abord une présentation succincte du système nerveux central (SNC) et de la neurotransmission sérotoninergique. Nous nous sommes en effet plus particulièrement intéressés à l'imagerie de récepteurs concernant la sérotonine. Nombre de ses récepteurs sont la cible de médicaments utilisés pour la prise en charge d'affections relevant de la neuropsychiatrie. Dans un second temps nous aborderons les principes de l'imagerie TEMP et de ses applications chez le petit animal pour des études méthodologiques et précliniques. Enfin nous présenterons et discuterons les résultats originaux que nous avons obtenus dans ce domaine.

1.1. Généralités sur le système nerveux central

Un cerveau humain compte environ 100 milliards de neurones et environ 10 à 50 fois plus de cellules gliales. C'est grâce à lui que nous pouvons penser, parler, rêver, ou encore lire cette thèse...

Le cortex est la partie la plus développée du cerveau chez les mammifères. On y distingue 4 lobes principaux, avec des fonctions relativement spécialisées. Ainsi le lobe frontal est principalement impliqué dans ce que l'on pourrait nommer la pensée abstraite ou l'imagination. Le lobe pariétal regroupe les aires sensorimotrices responsables du traitement des perceptions sensorielles relatives au toucher, à la température, à la douleur. Et le lobe occipital traite l'information visuelle alors que le lobe temporal est le siège de l'analyse des perceptions auditives, chez l'homme on y trouve notamment les aires afférentes au langage (dont la fameuse aire de Broca).

En plus du cortex il faut ajouter un certain nombre de structures plus internes qui constituent le système « limbique », responsable chez l'humain de ce que nous appelons les émotions et qui comprennent principalement l'hippocampe, l'amygdale et l'hypothalamus.

Enfin d'autres structures évolutivement plus anciennes, qui comprennent le tronc cérébral et le cervelet, contrôlent des fonctions vitales de l'organisme telles la fréquence cardiaque, la respiration, la température corporelle, etc.

L'idée de la spécialisation des aires corticales dans des fonctions précises est bien démontrée, cependant on sait aujourd'hui qu'elle est aussi relative, et que ces structures cérébrales ne fonctionnent pas de manière parfaitement indépendante, mais sont reliées par de nombreux faisceaux de fibres nerveuses (axones le plus souvent myélinisés, pour exemple le corps calleux) par lesquelles elles peuvent s'influencer mutuellement.

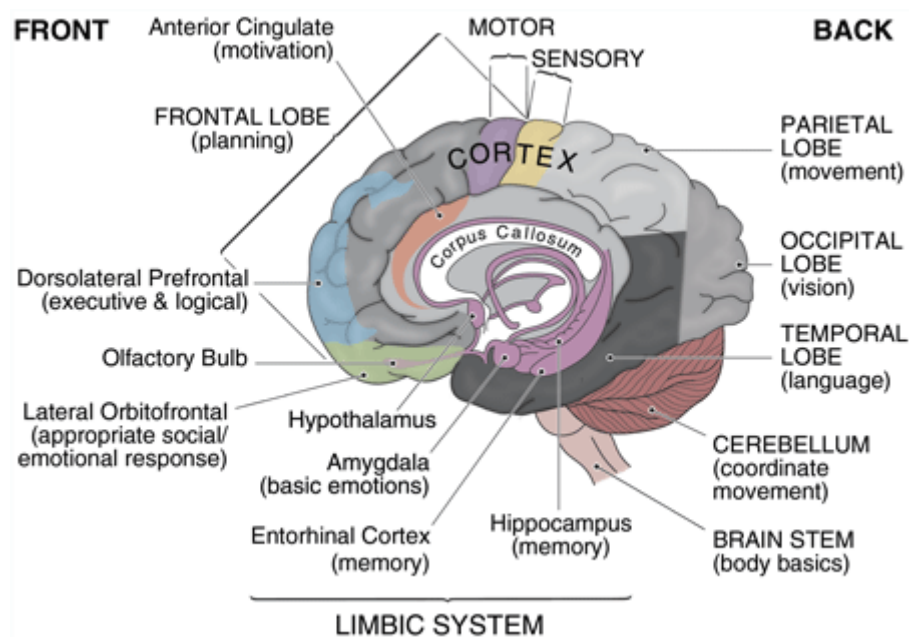


Figure 1 - Anatomie du cerveau humain. Principales régions et leurs implications fonctionnelles

(www.brainwaves.com)

1.1.1. Le niveau cellulaire

Le système nerveux est composé de plusieurs types de cellules dont les cellules gliales, les neurones et les oligodendrocytes à l'origine de la myéline.

Les cellules gliales (astrocytes et microglie) ne sont qu'indirectement impliquées dans la transmission de l'information nerveuse. Les astrocytes ont essentiellement un rôle de support pour les neurones auprès desquels ils sont par exemple des pourvoyeurs de glucose et de lactate. Ils sont par ailleurs impliqués dans des mouvements d'ions et le recaptage de neurotransmetteurs (comme le glutamate) afin d'en réguler les concentrations dans le milieu extracellulaire. Les astrocytes participent aussi à la formation de la barrière hémato-méningée et au bord des ventricules, certaines sous-populations assimilées à des cellules gliales spécialisées (les épendymocytes) sécrètent le liquide céphalo-rachidien.

Les neurones sont des cellules très asymétriques (corps cellulaire de 10 à 50 μm avec des prolongements axonaux de quelques centimètres à un mètre de long !). Ils sont hautement spécialisés dans la transmission de l'influx nerveux. Des dendrites jusqu'à l'extrémité de l'axone, c'est à la surface de la membrane neuronale, sous forme électrique que se propage le signal nerveux. Le passage de ce signal d'un neurone à un autre ayant lieu au niveau de structures particulières appelées synapses. Dans le système nerveux central, la plupart de ces synapses sont de type chimique. Notons tout de même qu'il existe aussi une neurotransmission non-synaptique : elle est qualifiée de volumique, et elle permet une neurotransmission sans nécessiter de contact étroit entre deux cellules. Loin d'être anecdotique la neurotransmission volumique est largement opérante dans le cortex, l'hippocampe et quelques autres structures cérébrales.

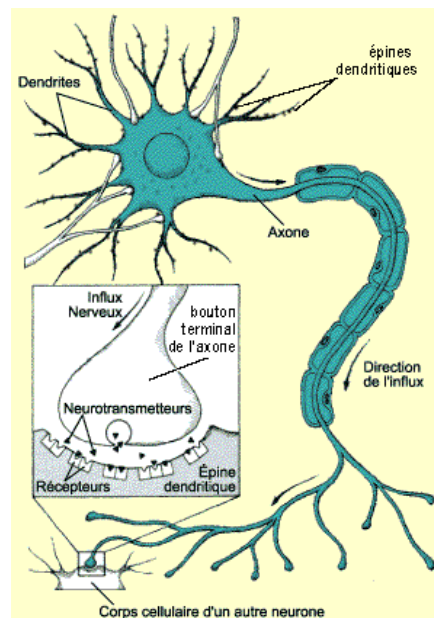


Figure 2 - Anatomie d'un neurone. L'encart représente une synapse de type chimique

(http://lecerveau.mcgill.ca/flash/i/i_01/i_01_cl/i_01_cl_ana/i_01_cl_ana.html)

1.1.2. Le niveau moléculaire

Les synapses chimiques assurent la transmission du signal nerveux d'un neurone à un autre par l'intermédiaire d'un neurotransmetteur, qui est émis par un neurone présynaptique, le plus souvent au niveau de ses terminaisons axonales, et qui diffuse dans l'espace synaptique pour se lier à des récepteurs situés à la surface de la membrane d'un neurone qualifié de postsynaptique.

De nombreux travaux ont permis d'identifier les principaux acteurs responsables de la transmission synaptique et on compte aujourd'hui plus d'une soixantaine de neurotransmetteurs et des centaines de sous-types de récepteurs.

Parmi les petites molécules qui constituent ce que l'on appelle les neurotransmetteurs dits « classiques », les plus connus sont : l'acétylcholine, la sérotonine, les catécholamines (comprenant l'adrénaline, la noradrénaline et la dopamine), des acides aminés excitateurs (comme l'aspartate et le glutamate, ce dernier étant présent dans une synapse sur deux du système nerveux central), des acides aminés inhibiteurs (comme la glycine et le GABA, qui est présent dans environ un tiers des synapses au niveau central), l'histamine, l'adénosine ou encore l'ATP. Les neuropeptides forment une autre grande famille de molécules neuromodulatrices, avec plus d'une centaine de représentants. Nombre d'entre eux ont aujourd'hui acquis le statut de neurotransmetteur ou de neurohormones.

Dans le cas des récepteurs métabotropiques couplés aux protéines G, la fixation du neurotransmetteur déclenche dans la cellule réceptrice des cascades de réactions impliquant la formation de seconds messagers (comme l'AMP cyclique, le diacylglycérol ou les phosphoinositols). Ces molécules prennent le relais des neurotransmetteurs à l'intérieur du cytoplasme de la cellule réceptrice et modulent l'activité de protéines effectrices, qui peuvent être par exemple des canaux ioniques, assurant ainsi la propagation de l'information d'un

neurone à l'autre. Les récepteurs de type ionotropique sont quant à eux des canaux ioniques eux-mêmes et leur activation est donc directement impliquée dans l'activité électrique (dépoléarisation) des neurones.

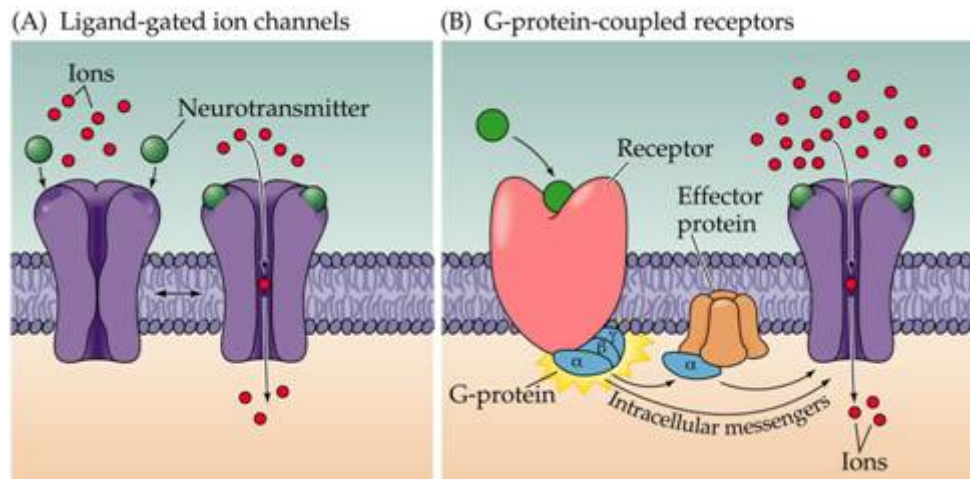


Figure 3 – Récepteur ionotropique et métabotrope. Principe du fonctionnement d'un récepteur ionotropique (A) et d'un récepteur métabotrope (B) (<http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/APFallLect18.html>)

1.1.3. La barrière hémato-encéphalique

La barrière hémato-encéphalique (BHE), est une barrière physiologique présente entre la circulation sanguine et le système nerveux central (SNC). Elle sert à préserver l'équilibre du milieu cérébral. Les cellules de l'endothélium capillaire, reliées entre elles par des jonctions serrées particulièrement étanches, en sont les composants essentiels.

La BHE joue le rôle d'un filtre extrêmement sélectif à travers lequel les nutriments nécessaires au cerveau sont transmis, et les déchets sont éliminés. En temps normal elle protège également le cerveau des agents pathogènes ou des toxines. Ces processus d'alimentation et d'élimination sont assurés par de nombreuses protéines transporteuses parmi

lesquelles on retrouve notamment des protéines de la famille MDR (« multi drug resistance »). Ces protéines sont largement distribuées à travers tout l'organisme et elles sont en particulier présentes à la face apicale des cellules de l'endothélium des capillaires cérébraux.

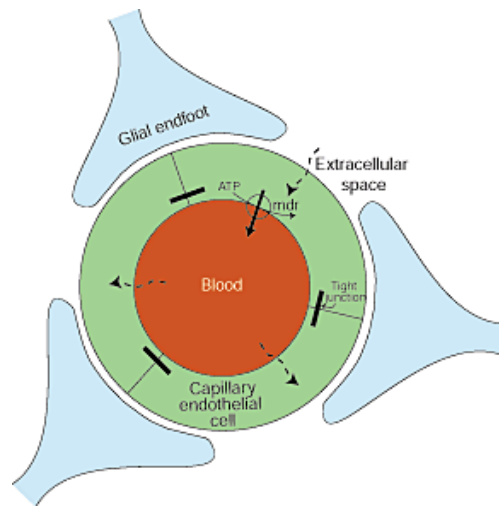


Figure 4 – La barrière hémato-encéphalique. Vue en coupe d'un capillaire cérébral, montrant les éléments de la BHE: jonctions serrées (tight junction) et transporteur de la famille MDR. (Edwards 2001)

La fonction de protection du cerveau assurée par ces transporteurs peut être un obstacle aux thérapies pharmacologiques lorsque la pénétration cérébrale du principe actif est souhaitée. Le même problème de franchissement de la barrière peut se poser avec les traceurs utilisés en imagerie, qui peuvent se retrouver exclus du cerveau par ces transporteurs, limitant ainsi considérablement leur utilité pour l'imagerie cérébrale.

1.2. La sérotonine

La sérotonine, ou 5-hydroxytryptamine (5-HT) est une petite molécule (poids moléculaire = 176.2 g/mol) appartenant à la famille des indolamines. Elle est ubiquitaire dans le règne

animal, et principalement connue pour son rôle de neurotransmetteur. (Mohammad-Zadeh, Moses et al. 2008)

1.2.1. Découverte de la sérotonine

En 1937, le scientifique Italien Vittorio Erspamer a montré qu'un extrait préparé à partir de cellules chromaffines de l'intestin était capable d'induire la contraction des muscles lisses. Il a également établi que cette action était due à une substance jusque là inconnue et comportant une fonction amine mais sans en déterminer complètement la structure chimique. Il nomma cette substance : entéramine. En 1948, une substance à l'action vasoconstrictrice était isolée et caractérisée pour la première fois dans le sérum de bœuf par Maurice M. Rapport, Arda Green, et Irvine Page (Rapport, Green et al. 1948). Cette découverte intervenait à la suite de décennies de recherches visant à identifier une substance vasoconstrictrice supposée être contenue par les plaquettes sanguines et jouant un rôle dans l'homéostasie. Comme cette substance était capable de réguler le tonus vasculaire, ils lui donnèrent le nom de sérotonine, en référence aux mots Latin *serum* et Grec *tonic*. Finalement en 1952, l'entéramine découverte une quinzaine d'années plus tôt, et la sérotonine s'avèreront être une seule et même molécule (Erspamer and Asero 1952). Ce après quoi l'abréviation 5-HT (pour 5-hydroxytryptamine, le nom chimique de la sérotonine) devint le terme le plus employé dans le domaine pharmacologique pour désigner cette molécule. La présence de 5-HT sera par la suite attestée dans de nombreux tissus comme les poumons, les reins ou encore le cerveau (Twarog and Page 1953). De par sa localisation cérébrale, le rôle de neurotransmetteur de la 5-HT sera rapidement suspecté, et les premières cartographies cérébrales de la 5-HT effectuées par des moyens pharmacologiques et histochimiques mettront en évidence des groupes de neurones spécifiques contenant de la 5-HT et formant un véritable système

sérotoninergique de neurotransmission (Dahlstrom and Fuxe 1964). Les rôles de la sérotonine dans la régulation de nombreuses fonctions du système nerveux central comme par exemple l'humeur, la prise alimentaire ou encore le sommeil, ont depuis été démontrés et les systèmes sérotoninergiques font aujourd'hui encore l'objet d'actives recherches.

1.2.2. Origine et métabolisme de la sérotonine

La sérotonine appartient à la famille des amines biogènes, au même titre que l'adrénaline, la noradrénaline et l'histamine. La biosynthèse de la sérotonine a lieu en deux étapes. Dans un premier temps, l'acide aminé essentiel qu'est le tryptophane, est hydroxylé par l'enzyme tryptophane hydroxylase (TPOH) pour produire le 5-hydroxytryptophane (5-HTP). Puis dans un second temps, le 5-HTP est décarboxylé par l'enzyme acide L-aminé aromatique décarboxylase pour former la 5-HT (Clark, Weissbach et al. 1954). L'action de ces deux enzymes est nécessaire pour assurer la conversion du tryptophane en sérotonine mais la première étape d'hydroxylation en est considérée comme l'étape limitante, une inhibition de ce seul enzyme conduisant à une diminution drastique de la production de sérotonine.

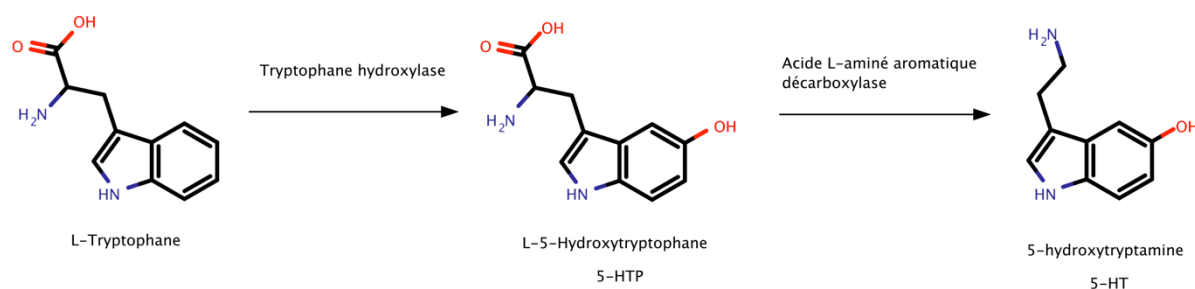


Figure 5 - Biosynthèse de la sérotonine

La sérotonine n'est synthétisée que dans les tissus exprimant l'enzyme tryptophane hydroxylase. Cette dernière existe sous plusieurs formes et c'est la tryptophane hydroxylase II

(TPOH II) qui participe à la synthèse de 5-HT dans les neurones centraux. Dans le cerveau, la 5-HT est exclusivement synthétisée dans les neurones des raphés et le noyau interpedonculaire. A la périphérie, la synthèse de la sérotonine est dépendante d'une autre TPOH (TPOH I) et a principalement lieu dans la glande pinéale et les cellules chromaffines de l'intestin. Les plaquettes ne sont pas connues pour être des sites de production de sérotonine, mais elles en représentent en revanche un site de stockage en dehors du SNC. En effet la sérotonine plasmatique principalement sécrétée par les cellules entérochromaffines est très labile (dégradation par les monoamines oxydases du foie). La sérotonine circulante est donc largement plaquettaire. (Toh 1954).

1.2.2.1. Distribution

On retrouve la sérotonine dans une dizaine de groupes de neurones distincts, localisés dans le pons et le mésencéphale (Dahlstrom and Fuxe 1964). Les noyaux du raphé sont les principaux noyaux sérotoninergiques. De ces groupes de neurones partent des faisceaux de fibres ascendantes vers le télencéphale et le diencéphale, ainsi que descendantes, s'étendant jusqu'à la médulla et la moelle épinière (voir Figure 6). Un petit nombre de corps cellulaires sérotoninergiques sont également présents dans les formations réticulaires mais leurs projections axonales restent surtout localisées dans le bulbe rachidien. Les raphés dorsal et médian sont les principaux pourvoyeurs de projections dans le cerveau antérieur et médian.

On estime que la sérotonine présente dans le cerveau ne représenterait que 5% environ de la sérotonine de l'organisme. Le pool le plus important de sérotonine est périphérique : le tractus digestif contiendrait environ 90% de la sérotonine totale de l'organisme.

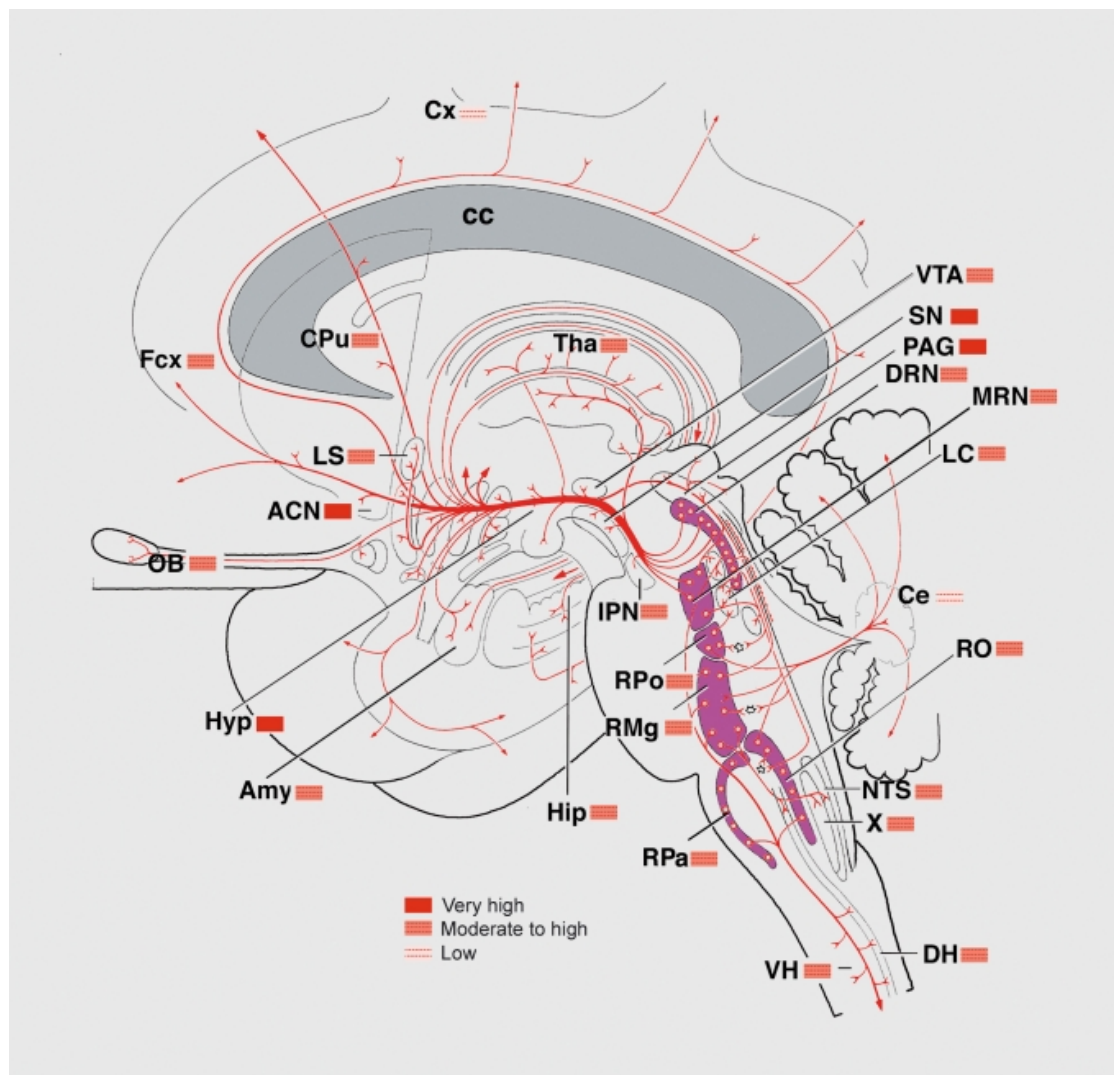


Figure 6 – Voies sérotoninergiques centrales. Vue sagittale schématique du cerveau humain montrant la répartition des systèmes sérotoninergiques. Les noyaux du raphé contenant la majorité des corps cellulaires sérotoninergiques apparaissent en violet. On voit ici que ces noyaux sont exclusivement situés dans le tronc cérébral. Les axones issus d'eux sont en rouge. Les pavillons colorés indiquent de façon relative la densité en afférences sérotoninergiques rencontrées dans chaque région. X, noyau moteur dorsal du nerf vague ; ACN, noyau accumbens ; Amy, amygdale ; cc, corps calleux ; Ce, cervelet ; CPU, noyau caudé-putamen ; Cx, cortex ; DH, corne dorsale de la moelle épinière ; DRN, noyaux du raphé dorsal ; Fcx, cortex frontal ; Hip, hippocampe ; Hyp, hypothalamus ; IPN, noyaux interpedonculaires ; LC, locus coeruleus ; LS, septum latéral ; MRN, noyaux du raphé médian ; NTS, noyaux du tractus solitaire ; OB, bulbes olfactives ; PAG, substance grise périaqueducule ; RMG, noyaux du raphé magnus ; RO, raphé Obscurus ; RPA, raphé pallidal ; RPO, noyaux raphé Pontis ; SN, substance noire ; Tha, thalamus ; VH, corne ventrale de la moelle épinière ; VTA, aire tegmentale ventrale (Charnay and Leger 2010)

1.2.2.2. *Stockage*

Dans les cellules sérotoninergiques, la sérotonine est synthétisée puis stockée dans des vésicules. La presque totalité de la sérotonine de l'organisme est intracellulaire, ce qui implique une forte régulation de la sérotonine. Le stockage de la sérotonine dans les vésicules est assuré par des transporteurs de la famille des «Vesicular Monoamine Transporters », VMATs ou Transporteurs Vésiculaires des Monoamines.

1.2.2.3. *Libération*

Dans le SNC, l'arrivée du signal électrique au niveau des terminaisons axonales d'un neurone présynaptique entraîne la fusion des vésicules de stockage avec la membrane, libérant la sérotonine dans l'espace synaptique (ou fente synaptique). Elle est alors libre de se lier aux récepteurs sérotoninergiques disponibles, assurant ainsi le passage de l'information nerveuse.

Les récepteurs peuvent être portés par une cellule post-synaptique, ou situés sur le neurone présynaptique lui-même dans le cas des autorécepteurs. La liaison de la sérotonine à des autorécepteurs agit comme rétrocontrôle négatif et permet de limiter la libération de sérotonine (Charnay and Leger 2010).

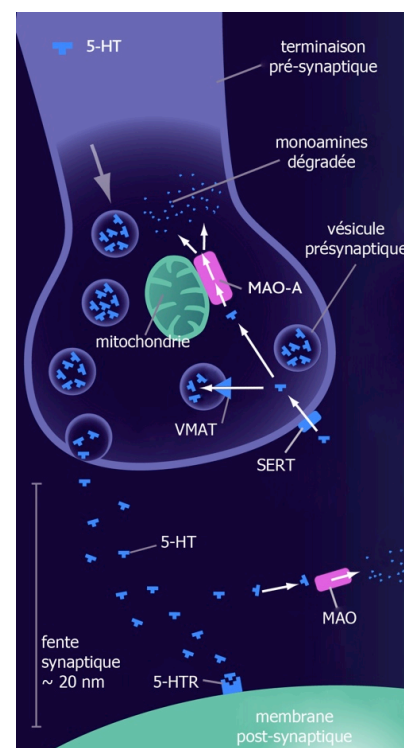
1.2.2.4. *Inactivation*

L'action de la sérotonine au niveau de la synapse est limitée dans le temps par deux processus d'inactivation qui permettent de réguler la concentration en sérotonine dans le milieu extracellulaire : la recapture du neurotransmetteur au niveau intracellulaire et le catabolisme enzymatique.

De même que pour les autres amines biogènes, le catabolisme enzymatique de la 5-HT est principalement assuré par les monoamines oxydases (MAO) (Mc and Page 1959). La sérotonine est principalement métabolisée par l'isoforme A de l'enzyme MAO, la MAO-B ne représentant qu'une part mineure du métabolisme de la 5-HT. Le principal métabolite résultant de la dégradation de la sérotonine par les MAO est l'acide 5-hydroxyindolacétique (5-HIAA), qui est majoritairement excrété par les urines. Les MAO sont principalement actives dans le cerveau, le tractus gastro-intestinal, les poumons, le foie, et les plaquettes (Tyce 1990). Bien que sa dégradation par les MAO soit extrêmement rapide, le stockage dans les vésicules intracellulaires met la 5-HT à l'abri du catabolisme.

Mais la principale voie de régulation du taux de 5-HT extracellulaire est en fait son recapture vers l'espace intracellulaire grâce à un transporteur spécifique, le SERT (« serotonin transporter »). Cette protéine réalise un co-transport de la 5-HT avec une paire d'ions Na^+/Cl^- et l'éjection d'un ion K^+ (Larsen, Sonders et al. 2011). C'est un transporteur saturable, ATP-dépendant qui possède une grande affinité pour la sérotonine.

Figure 7 - La synapse sérotoninergique. Mécanismes de stockage, libération, recapture et inactivation de la sérotonine au niveau d'un contact synaptique. 5-HT : 5-hydroxytryptamine, VMAT : transporteur vésiculaire des monoamines, MAO : monoamine oxydase, 5-HTR : récepteur sérotoninergique, SERT : transporteur de recapture de la sérotonine. Adapté d'après www.cnsforum.com



1.2.3. Les récepteurs à la sérotonine

La 5-HT exerce ses divers effets physiologiques par l'intermédiaire d'une famille très étendue de récepteurs membranaires (Tableau 1). La plupart de ces récepteurs sont phylogénétiquement très anciens et seraient apparus au cours de l'évolution il y a 750 millions d'années, ils sont présents des invertébrés les plus simples jusqu'aux mammifères les plus évolués (Peroutka and Howell 1994).

Table 16-3 Serotonin Receptor Subtypes. (See Also Chapter 21.)				
Receptor Subtype	Distribution	Postreceptor Mechanism	Partially Selective Agonists	Partially Selective Antagonists
5-HT _{1A}	Raphe nuclei, hippocampus	G _i , ↓ cAMP	8-OH-DPAT	WAY100635
5-HT _{1B}	Substantia nigra, globus pallidus, basal ganglia	G _i , ↓ cAMP	Sumatriptan, CP93129	
5-HT _{1D}	Brain	G _i , ↓ cAMP	Sumatriptan	
5-HT _{1E}	Cortex, putamen	G _i , ↓ cAMP		
5-HT _{1F}	Cortex, hippocampus	G _i , ↓ cAMP	LY334370	
5-HT _{1P}	Enteric nervous system	G _o , slow EPSP	5-Hydroxyindalpine	Renzapride
5-HT _{2A}	Platelets, smooth muscle, cerebral cortex	G _q , ↑ IP ₃	α-Methyl-5-HT	Ketanserin
5-HT _{2B}	Stomach fundus	G _q , ↑ IP ₃	α-Methyl-5-HT	SB204741
5-HT _{2C}	Choroid, hippocampus, substantia nigra	G _q , ↑ IP ₃	α-Methyl-5-HT	Mesulergine
5-HT ₃	Area postrema, sensory and enteric nerves	Receptor is a Na ⁺ -K ⁺ ion channel	2-Methyl-5-HT, <i>m</i> -chlorophenylbiguanide	Granisetron, ondansetron, tropisetron
5-HT ₄	CNS and myenteric neurons, smooth muscle	G _s , ↑ cAMP	5-Methoxytryptamine, renzapride, metoclopramide	
5-HT _{5A,B}	Brain	↓ cAMP		
5-HT _{6,7}	Brain	G _s , ↑ cAMP		Clozapine (5-HT ₇)

8-OH-DPAT = 8-Hydroxy-2-(di-*n*-propylamine)tetralin; CP93129 = 5-Hydroxy-3(4-1,2,5,6-tetrahydropyridyl)-4-azaindole; LY334370 = 5-(4-fluorobenzoyl)amino-3-(1-methylpiperidin-4-yl)-1*H*-indole fumarate; SB204741 = *N*-(1-methyl-5-indolyl)-*N'*-(3-methyl-5-isothiazolyl)urea; WAY100635 = *N*-*tert*-Butyl 3-4-(2-methoxyphenyl)piperazin-1-yl-2-phenylpropanamide.

Tableau 1 – Les récepteurs sérotoninergiques (source : <http://pharm-project.wikispaces.com/Reglan>)

Des études pharmacologiques de liaison ligand-récepteur réalisées avec des radioligands ont permis la caractérisation de multiples types de récepteurs à la sérotonine. La nomenclature actuelle reconnaît l'existence de 7 familles différentes de récepteurs 5-HT (de 5-HT₁ à 5-HT₇)

(Hoyer, Clarke et al. 1994). La plupart de ces familles comprennent elles-mêmes plusieurs sous-types (par exemple 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, etc.). Ces différents sous-types peuvent eux même dériver d'épissages alternatifs et de variants d'édition ce qui en accroît encore la diversité (Charnay and Leger 2010).

La grande diversité de ses récepteurs permet de conférer à la sérotonine des actions spécifiques en fonction du type de récepteurs exprimés par la cellule réceptrice. La majorité des récepteurs de la sérotonine sont métabotropiques. Seuls les récepteurs 5-HT₃ ne sont pas métabotropiques mais ionotropiques, ils permettent le passage des ions Na⁺, K⁺ et Ca²⁺ à travers la membrane cellulaire lorsqu'ils sont activés.

Grâce à ses récepteurs, la sérotonine joue un rôle majeur dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques. Pour des raisons que nous verrons plus loin, nous ne nous intéresserons dans cette étude qu'aux récepteurs 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} et 5-HT₄ ainsi qu'au transporteur SERT.

1.2.3.1. Le récepteur 5-HT_{1A}

Les premiers sites récepteurs de haute affinité pour la sérotonine ont été identifiés par des expériences pharmacologiques de liaison, faites avec de la 5-HT marquée au tritium (Peroutka and Snyder 1979). Par la suite le développement d'autres ligands sélectifs a permis la discrimination entre plusieurs sous-types de récepteurs 5-HT₁.

Au niveau périphérique, ces récepteurs interviennent dans la régulation de la motilité des muscles lisses.

Au niveau central, l'hippocampe contient une forte densité de récepteur 5-HT₁ et principalement de type 5-HT_{1A}. D'autres régions comme le septum, et certains noyaux de

l'amygdale et des raphés sont également riches en récepteurs 5-HT_{1A} (Marcinkiewicz, Verge et al. 1984). Dans ces régions, le 5-HT_{1A} est essentiellement retrouvé en position post-synaptique, mais il est aussi présent au niveau pré-synaptique en tant qu'autorécepteur sur les corps cellulaires des noyaux raphés.

Ce motif de distribution des récepteurs 5-HT_{1A} est commun aux mammifères, l'homme y compris. Plusieurs des structures dans lesquelles on retrouve ce récepteur font partie du système limbique, responsable de la modulation des émotions. Les agonistes 5-HT_{1A} ont un effet anxiolytique, diminuent la pression sanguine et le rythme cardiaque, et induisent également une hyperphagie. Le rôle des récepteurs 5-HT_{1A} dans l'anxiété a été démontré dans de nombreuses études, voir Donaldson et al. (Donaldson, Nautiyal et al. 2013) pour une revue sur le sujet.

1.2.3.2. Le récepteur 5-HT_{2A}

Le récepteur 5-HT_{2A} est ubiquitaire dans l'organisme. Au niveau périphérique, il est largement répandu et son activation est responsable d'une contraction du muscle lisse aux niveaux vasculaire, bronchique, utérin, et urinaire. Il est également capable d'induire l'agrégation plaquettaire et une augmentation de la perméabilité capillaire.

Au niveau central, dans le cortex, l'hippocampe et le ganglion basal, les récepteurs 5-HT_{2A} occupent généralement une position post-synaptique.

Des données récentes indiquent que la dérégulation des voies de transmission assurées par les récepteurs 5-HT_{2A} joue un rôle dans les manifestations de la schizophrénie (principalement les hallucinations) (Muguruza, Moreno et al. 2012). Les antagonistes des récepteurs 5-HT_{2A} qui traversent la BHE ont des propriétés antipsychotiques (Ebdrup,

Rasmussen et al. 2011). Ils sont indiqués dans le traitement des schizophrénies, des accès maniaques et de l'agressivité.

1.2.3.3. Le récepteur 5-HT₄

A la périphérie, on retrouve ce récepteur principalement dans le tractus digestif, où son activation semble promouvoir la motilité et stimuler les sécrétions intestinales. On le retrouve également au niveau des oreillettes cardiaques chez l'homme, où son activation accélère le rythme cardiaque et diminue la contractilité des fibres musculaires.

Au niveau central le récepteur 5-HT₄ est retrouvé notamment dans les tubercules olfactifs, le noyau accumbens, le globus pallidus, et l'hippocampe. Cette distribution évoque une possible influence de ce récepteur sur des fonctions émotionnelles, et la contribution des récepteurs 5-HT₄ dans la modification des comportements alimentaires en réponse au stress a également été démontrée (Jean, Conductier et al. 2007).

Les agonistes 5-HT₄ augmentent la motilité intestinale et pourraient être utilisés dans le traitement du reflux gastro-oesophagien et de la parésie intestinale.

1.2.4. Le Transporteur de la sérotonine

A la périphérie les SERT sont exprimés par de nombreux tissus (Faraj, Olkowski et al. 1994), par exemple les plaquettes sanguines, où ils permettent de stocker la sérotonine nécessaire à l'agrégation plaquettaire, ou les cellules de l'épithélium intestinal où ils permettent le contrôle des concentrations de sérotonine intervenant dans la motilité gastro-intestinale.

Dans le système nerveux central, la distribution des SERT coïncide étroitement avec la distribution des neurones sérotoninergiques et leurs projections. En effet, ces transporteurs sont situés le long des projections axonales et dendritiques, ainsi qu'aux extrémités terminales et au niveau des corps cellulaires des neurones sérotoninergiques. Les régions cérébrales les plus riches en SERT sont : les noyaux du raphé, la substance grise périaqueducule, le noyau interpedunculaire, la substance noire, l'hippocampe, l'amygdale, le thalamus, l'hypothalamus, le putamen, le septum latéral, le cortex frontal et les bulbes olfactifs.

L'activité des SERT pourrait jouer un rôle dans les troubles de l'humeur, les inhibiteurs sélectifs de recapture de la sérotonine (ISRS) figurant parmi les médicaments les plus couramment prescrits pour le traitement de la dépression (Nicastro 2012). Les ISRS s'avèrent être des antidépresseurs en clinique, mais leur mécanisme d'action n'est pas totalement élucidé : leur effet antidépresseur n'apparaît qu'en deux à trois semaines, alors que leur effet inhibiteur de la recapture est immédiat. Cet effet différé évoque donc un mécanisme d'action plus complexe que la seule inhibition du SERT. Cet effet pourrait par exemple passer par une modification du niveau d'expression du SERT, il y a donc un intérêt à être capable de suivre cette protéine *in vivo* par imagerie.

1.3. La tomographie d'émission monophotonique

L'imagerie TEMP fait partie des techniques d'imagerie moléculaire. Elle est basée sur l'utilisation de molécules radiomarquées (ou traceurs), ayant une affinité pour une cible donnée ou ayant un devenir métabolique particulier. En permettant le suivi de la distribution du traceur radioactif après injection dans l'organisme, la TEMP autorise l'étude *in vivo* de cibles ou de processus biologiques dynamiques. Ainsi l'utilisation de ligands des récepteurs membranaires des neurotransmetteurs en tant que traceur TEMP permet de quantifier les

densités de récepteurs disponibles dans le cerveau. L'intérêt en neuropsychologie est considérable puisqu'il devient possible d'envisager de corréler un déficit cognitivo-comportemental précis à une anomalie spécifique d'un système neurotransmetteur.

1.3.1. La radioactivité

La radioactivité est un phénomène physique naturel au cours duquel des noyaux atomiques instables se désintègrent pour se transformer en des noyaux atomiques plus stables, tout en dégageant de l'énergie sous forme de rayonnements. On distingue, selon le type de rayonnement, les rayons α (alpha), β (bêta), ou γ (gamma). Ces rayonnements sont dits ionisants : ils sont suffisamment énergétiques pour arracher des électrons aux atomes environnants.

Le rayonnement γ est un faisceau de photons de haute énergie au fort pouvoir de pénétration dans la matière, suffisant pour traverser un organisme vivant et être détecté en imagerie scintigraphique. Ce sont des isotopes émetteurs γ qui sont utilisés en imagerie TEMP.

Les radionucléides émetteurs γ les plus couramment utilisés en médecine nucléaire sont le technétium 99m et l'iode 123 (^{123}I). Le ^{123}I a une demi-vie de 13,2 heures environ et une de ses principales énergies de rayonnement se situe vers 159 keV. Cependant chez le petit animal de laboratoire, l'épaisseur de tissu nécessaire à traverser par les radiations pour s'échapper du corps du sujet est typiquement plus faible que chez l'homme, et on peut aussi envisager l'emploi d'émetteurs gamma moins énergétiques comme l'iode 125, qui émet un rayonnement gamma d'une énergie d'une trentaine de keV seulement.

1.3.1.1. *Activité*

L'activité d'une source radioactive, correspond au nombre de désintégrations qui se produisent dans cette source en l'espace d'une seconde, elle est proportionnelle au nombre d'atomes radioactifs en présence. Son unité internationale est le Becquerel (Bq). Le Curie (Ci) est une unité ancienne qui est définie comme l'activité d'un gramme de radium, soit 37×10^9 désintégrations par seconde ($37 \text{ Bq} = 1 \text{ nCi}$).

La désintégration de l'isotope radioactif fait constamment diminuer le nombre d'atomes radioactifs présents, cette diminution suit une loi de décroissance exponentielle.

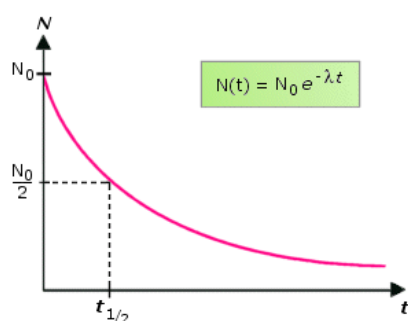


Figure 8 - Loi de décroissance radioactive. Où $N(t)$ est le nombre d'atome à l'instant t , N_0 le nombre d'atome initialement présents, e la constante d'Euler, λ le taux de décroissance de l'isotope considéré, et t le temps. La durée nécessaire à la désintégration de la moitié du nombre d'atome présents initialement est appelée la demi-vie ($t_{1/2}$). (<http://www.maxicours.com/se/fiche/9/6/22096.html>)

1.3.1.2. *Activité spécifique*

Pour un radiotraceur, l'activité spécifique est définie comme l'activité radioactive observée pour une quantité de molécules de traceur donnée. Cette grandeur est essentielle à la quantification des images scintigraphiques, car elle permet de relier l'intensité du signal radioactif détecté au nombre de molécules de traceur en présence et au final au nombre de molécules de la cible biologique que l'on souhaite quantifier.

1.3.2. Radiochimie

La radiochimie permet de marquer des molécules traceuses spécifiques d'une cible moléculaire ou d'une fonction biologique avec un radionucléide sans les dénaturer et leur faire perdre leur affinité pour la cible. Certains radionucléides sont directement utilisables comme traceurs sans molécule vectrice, comme par exemple les isotopes de l'iode pour l'étude de la fonction thyroïdienne. Les stratégies de marquage utilisables dépendent essentiellement du radionucléide employé.

Ainsi, dans le cas des radionucléides de la classe des métaux comme le technétium 99m, il n'est pas possible d'établir de liaison covalente avec une molécule vectrice organique et l'on doit faire appel à des liaisons de coordination qui permettent la formation d'un complexe entre le vecteur et le radionucléide, pour former le radiotraceur. A cause de l'encombrant nuage électronique des métaux, ces complexes sont volumineux et les radiotraceurs obtenus sont généralement des traceurs fonctionnels, permettant le suivi d'un processus biologique plutôt que d'une protéine cible en particulier.

En revanche, pour les radionucléides non-métaux, la création d'une liaison covalente avec le vecteur est envisageable, généralement par des réactions de substitutions nucléophiles ou électrophiles. Les molécules de faible poids moléculaire, comme des ligands de récepteurs ou transporteurs neuronaux, peuvent ainsi être marquées par des radionucléides de la famille des halogènes comme le fluor 18 (pour l'imagerie TEP), ou l'iode 123 (pour l'imagerie TEMP).

1.3.3. Instrumentation TEMP

La détection des rayons γ émis par le radiotraceur est assurée par une gamma-caméra dans laquelle les photons γ incidents viennent interagir avec un scintillateur, qui est un cristal de

composition propre à arrêter les photons de haute énergie et à les convertir en une multitude de photons lumineux, dont le nombre est proportionnel à l'énergie du photon gamma initial. Le signal lumineux obtenu est ensuite amplifié par des tubes photomultiplicateurs qui fournissent au final un signal électrique, toujours proportionnel à l'énergie du photon gamma initial. En fait, une multitude de tubes photomultiplicateurs est placée derrière le scintillateur, et la détection conjointe par plusieurs d'entre eux, du flash lumineux produit par un unique photon gamma incident, permet de localiser de façon relativement précise les coordonnées de l'endroit où a eut lieu l'interaction sur le cristal.

Cependant, pour permettre de localiser dans l'espace la source d'où a été émis ce photon, une information sur la direction de propagation de ce photon est nécessaire. Une manière d'obtenir cette information est de placer un collimateur entre la source et le détecteur (Figure 9). Un collimateur est un écran capable d'arrêter le rayonnement gamma et qui porte une ou plusieurs ouvertures pour le passage des photons. Ainsi seuls les photons se propageant sur les trajectoires permises par les ouvertures du collimateur pourront atteindre le scintillateur. La connaissance de leur point d'impact sur le scintillateur et de la position de l'ouverture par laquelle ils sont passés détermine alors leur direction. Le signal peut alors être analysé informatiquement afin de reconstruire une image reproduisant la distribution de la radioactivité chez le patient.

Bien sûr, l'utilisation de cette solution implique de se priver de l'information qu'auraient pu apporter tous les photons arrêtés par le collimateur. Or, plus les ouvertures portées par le collimateur sont de faible taille, et plus la précision sur la direction des photons incidents sera grande. Ainsi, afin d'obtenir une précision spatiale suffisante pour l'imagerie chez le petit animal, les scanners qui leur sont dédiés sont contraints d'employer des collimateurs portant des ouvertures de très faible taille, qui sont essentiellement des trous de l'ordre d'un millimètre de diamètre et qui sont appelés des sténopés (ou en anglais « pinholes »). Une

solution pour pallier la perte en sensibilité de détection due à l'usage d'ouvertures minuscules, est de multiplier le nombre de ces sténopés, cette stratégie ayant donné naissance aux collimateurs multi-sténopés qui sont aujourd'hui au principe des scanners TEMP à usage préclinique (Nuyts, Vunckx et al. 2009).

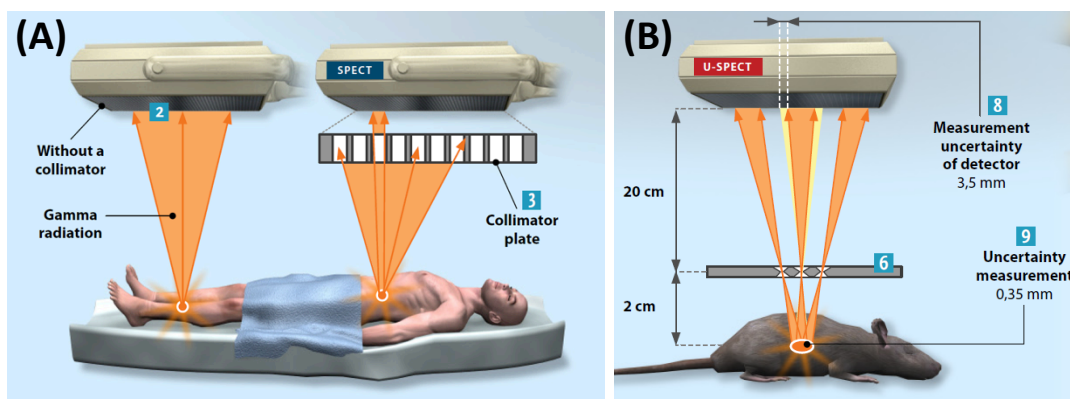


Figure 9 - Exemple de collimateurs utilisé en TEMP. Collimateur parallèle (A), seul les photons incidents se propageant perpendiculairement aux plans du détecteur et du collimateur ne sont pas arrêtés ; collimateur de type multi-sténopés ou « multi-pinhole » (B), conduisant à la formation de plusieurs images projetées sur le détecteur (<http://www.milabs.com/>)

1.4. Quantification par modélisation pharmacocinétique

Jusqu'ici nous avons vu comment l'imagerie TEMP permet de mesurer la distribution d'une source radioactive dans l'espace, cependant la véritable information recherchée n'est pas la distribution du traceur elle-même mais celle de sa cible biologique. Ces deux informations ne sont pas toujours parfaitement identiques, et les méthodes de quantification par modélisation pharmacocinétique sont un moyen de les distinguer.

Ces méthodes nécessitent la mesure de l'évolution du signal radioactif au cours du temps

dans l'organisme, donnée également appelée une cinétique. Le traitement de ces cinétiques, observées localement dans des régions déterminées, permet d'extraire du modèle utilisé des paramètres, correspondant notamment à la densité locale en cible du traceur.

1.4.1. Interaction ligand-récepteur

Tous les modèles pharmacologiques *in vivo* de l'interaction ligand-récepteur sont fondés sur la loi d'action de masse, qui peut servir à décrire l'équilibre d'association d'un ligand avec un récepteur (Figure 10).

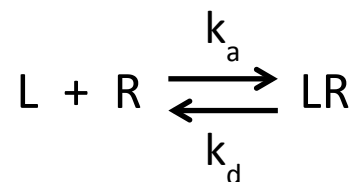


Figure 10 - Equilibre ligand récepteur. L = concentration en ligand (traceur libre), R = concentration en récepteur libre, LR = concentration en complexe ligand-récepteur, k_a = constante de vitesse d'association, k_d = constante de vitesse de dissociation

Les études *in vitro* de liaison réalisées avec des radioligands permettent de mesurer la quantité totale de récepteur en présence (B_{\max}), qui est égale à la quantité maximale de ligand pouvant être liée au récepteur, soit $B_{\max} = R + LR$. Elles permettent également d'évaluer l'affinité du ligand pour sa cible, qui est le plus souvent indiquée par la valeur de la constante de dissociation à l'équilibre : K_d , définie comme $K_d = LR / (L * R)$. Contrairement à la constante de dissociation cinétique (k_d), K_d est une constante à l'équilibre et est exprimée avec un K majuscule.

Dans les expériences *in vitro*, l'expérimentateur est maître de la quantité de ligand libre

introduit initialement et peut également avoir accès à la mesure de la fraction de traceur lié au récepteur (LR). Ces deux informations étant nécessaires pour pouvoir calculer le B_{\max} .

1.4.2. Modélisation *in vivo*

Au contraire de la situation *in vitro*, il n'est pas simple de connaître la concentration de traceur réellement en présence du récepteur dans le cas d'une étude *in vivo*. En effet, celle-ci dépend de multiples processus, comme par exemple du passage de la BHE, ou encore de la liaison du traceur aux protéines plasmatiques. Il n'est, de plus, pas simple non plus d'isoler le signal provenant du traceur spécifiquement lié à sa cible. En effet, le signal récolté lors de la scintigraphie est issu du radionucléide quelque soit l'état du traceur : que celui soit lié à sa cible ou non. Or, à tous moments le traceur forme différentes populations : ainsi on peut distinguer le traceur lié spécifiquement à sa cible, le traceur libre non lié, ou encore le traceur lié de façon non spécifique, par stockage dans les membranes lipidiques par exemple. Ainsi les données tomographiques contiennent du signal dit spécifique, qui est le signal émis par le traceur lié à la cible, mais également du signal dit non spécifique, qui ne correspond pas à la présence de la cible. L'identification des différentes composantes du signal global enregistré par la caméra n'est possible que de manière théorique, en utilisant des modèles mathématiques simulant quantitativement les étapes de la distribution du radioligand entre la circulation sanguine où il est injecté, jusqu'à son interaction avec les sites récepteurs.

Il ne sera ici question que des méthodes d'analyse compartimentale, qui fournissent des informations quantitatives sur la cible d'un ligand donné, grâce au calcul de constantes pharmacocinétiques qui caractérisent le transfert de ce ligand entre le compartiment plasmatique, cérébral et sa cible (Slifstein and Laruelle 2001).

1.4.2.1. Méthodes compartimentales

Le but de l'analyse compartimentale est de proposer un modèle mathématique décrivant au mieux la cinétique d'un ligand dans l'organisme et son interaction avec des sites tissulaires de liaison spécifiques et/ou non spécifiques. Ce modèle se présente sous forme d'un assemblage de compartiments entre lesquels des échanges de radioligand ont lieu à des vitesses fixes, déterminées par des constantes cinétiques. Chaque compartiment représente un état biologique ou physique du traceur dans l'organisme, par exemple la concentration de traceur libre ou lié spécifiquement à sa cible.

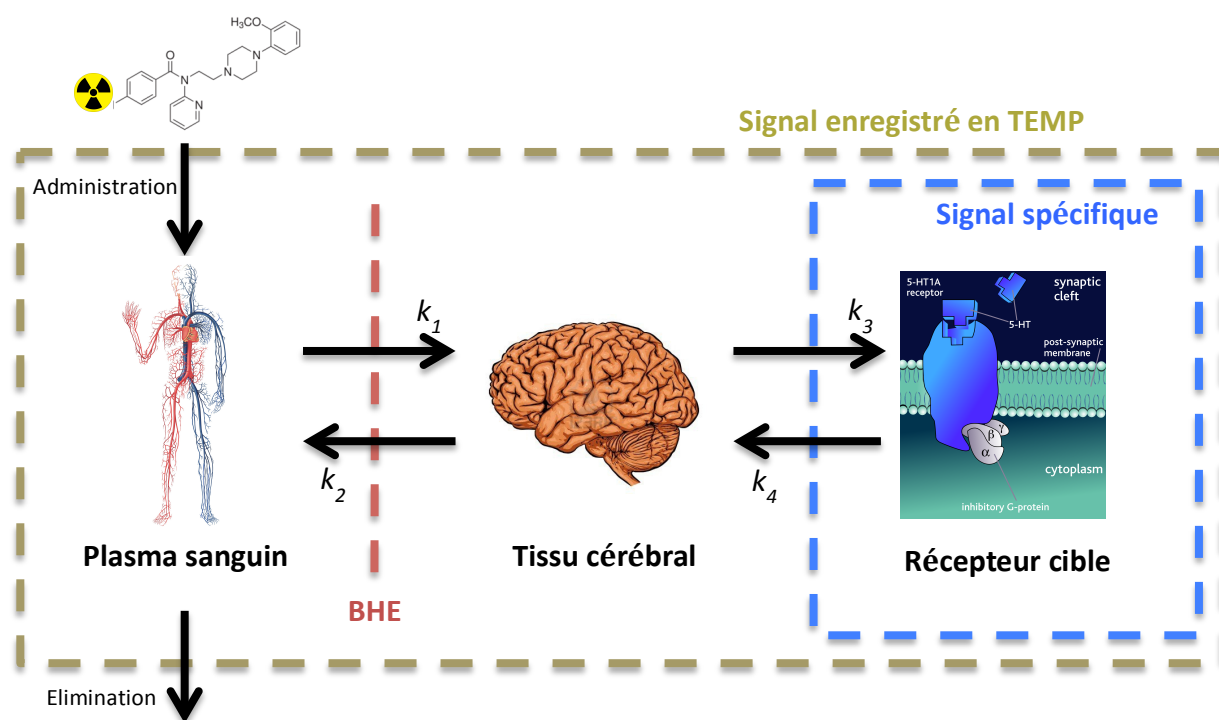


Figure 11 - Exemple de modèle compartimental. Après injection, un radiotracer de neurorécepteur doit franchir la barrière hémato-encéphalique puis se lier à son récepteur. On peut donc décrire la distribution du traceur par un pool plasmatique, un pool cérébral non-lié spécifiquement et un pool lié à la cible. Les échanges entre ces pools ont lieu à des vitesses constantes, fixées par les constantes cinétiques $k_{1,2,3,4}$.

Une fois le modèle de départ choisi, les paramètres du modèle seront optimisés à partir de deux données expérimentales.

La première est la fonction d'entrée plasmatique (soit la concentration plasmatique du traceur libre non métabolisé), ou alternativement la cinétique de l'activité dans une région de référence, région qui doit être autant que possible dénuée de la cible spécifique du radioligand. L'activité dans une région de référence peut être obtenue à partir des données TEMP elles-mêmes, alors que la mesure de la véritable fonction d'entrée plasmatique nécessite des prélèvements sanguins et leur analyse, afin de doser le traceur présent sous forme libre et non métabolisé.

La deuxième donnée nécessaire au modèle est fournie par les séries d'images TEMP enregistrées au cours du temps, ce sont les cinétiques radioactives dans chacune des régions de l'image pour lesquelles on souhaite optimiser les paramètres du modèle. Ces régions sont appelées régions d'intérêt.

L'optimisation des paramètres du modèle a lieu de façon itérative par des cycles de : simulation de données, comparaison aux données expérimentales et ajustement des paramètres du modèle. La simulation est réalisée à partir de la fonction d'entrée, ou de la cinétique de la région de référence, et grâce à l'équation du modèle choisi qui décrit la relation entre la fonction d'entrée et les cinétiques de chaque région d'intérêt. L'erreur entre ces cinétiques simulées et celles observées expérimentalement est calculée, et les paramètres du modèle sont ajustés en conséquence. Ce processus aboutit à l'identification, pour chaque région d'intérêt, d'une combinaison de paramètres pour lesquels l'écart entre la simulation et les données réelles est minimale.

Dans le cas où une région de référence dénuée de cible est connue pour le traceur considéré, on peut utiliser des modèles dont l'équation ne tient plus compte de la

concentration plasmatique du traceur libre non métabolisé, permettant ainsi de s'affranchir de la nécessité de déterminer cette dernière par des prélèvements sanguins. Toutefois, la quantification d'une cible par une méthode avec région de référence est par définition une mesure relative. Il est donc impossible d'accéder à une mesure absolue du nombre de récepteurs (le B_{\max} vu plus haut). En revanche, un indicateur robuste et largement utilisé pour la quantification relative d'une cible est le potentiel de liaison (« binding potential ») ou BP. Sa valeur dépend en même temps de l'affinité du radioligand et de la densité en récepteur cible ($BP = B_{\max} / K_d$), le BP reflète ainsi la disponibilité du récepteur cible.

Le modèle SRTM (« Simplified Reference Tissue Model ») développé par Lammertsma et al. (Lammertsma and Hume 1996), est comme son nom l'indique un modèle avec région de référence (voir Figure 12). Il repose sur une équation dans laquelle les seuls paramètres à optimiser sont les suivants : R_1 , k_2 et BP. R_1 est le rapport entre le taux de transfert du traceur depuis le plasma vers la région d'intérêt sur le taux de transfert vers la région de référence ($R_1 = K_1/K_1'$), k_2 est le taux d'efflux depuis le tissu riche en cible en direction du plasma et BP est toujours le potentiel de liaison mais, ici, les hypothèses simplificatrices du modèle permettent de le définir autrement : $BP = k_3/k_4$. Selon la nomenclature actuelle ce type de potentiel de liaison doit être noté BP_{ND} pour signaler qu'il a été calculé à partir d'une évaluation de la fraction du traceur liée de façon non spécifique (ou Non Déplaçable), il est de plus une grandeur sans unité (Innis, Cunningham et al. 2007).

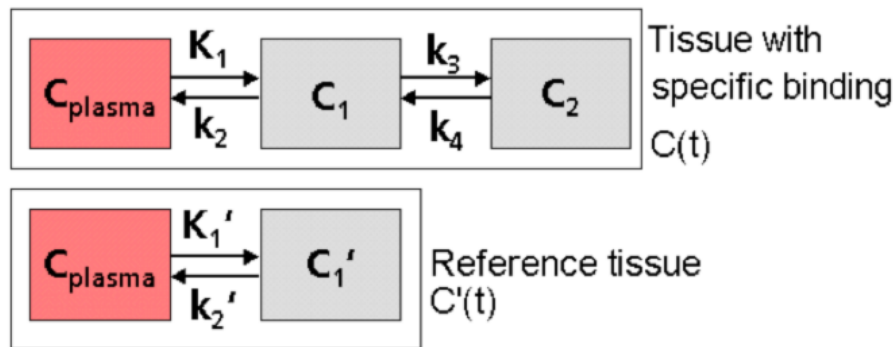


Figure 12 – Le modèle SRTM. Compartiments et constantes cinétiques les reliant. C_{plasma} représente la concentration en traceur dans le plasma, C_1 et C_1' sont les concentrations en traceur libre dans les régions d'intérêt et de référence respectivement, C_2 est la concentration en traceur lié à la cible dans la région d'intérêt, K_1 et K_1' sont les constantes cinétiques d'entrée dans les régions d'intérêt et de référence respectivement, k_2 et k_2' sont les constantes cinétiques de sortie vers le plasma dans les régions d'intérêt et de référence respectivement. Les constantes k_3 et k_4 décrivent respectivement le passage du traceur à l'état spécifiquement lié et son retour à l'état libre au sein de la région d'intérêt. Les données TEMP correspondent à $C(t)$ et $C'(t)$, qui sont les cinétiques mesurées respectivement dans les régions d'intérêt et de référence. (Lammertsma and Hume 1996)

1.5. Intérêts de la TEMP chez le petit animal

L'imagerie TEMP permet d'étudier au niveau biochimique et de façon non invasive des processus biologiques dynamiques. La possibilité de caractériser *in vivo* le phénotype fonctionnel de modèles animaux fait ainsi de l'imagerie TEMP petit animal une méthode appropriée pour l'étude des mécanismes physiopathologiques de maladies de même que pour la surveillance de l'efficacité thérapeutique de nouveaux traitements ou produits pharmaceutiques (Apostolova, Wunder et al. 2012 ; Liu, Lunsford et al. 2012 ; Pullambhatla, Tessier et al. 2012).

Dans le domaine de la neuropsychiatrie, la TEMP peut être utilisée pour effectuer une mesure quantitative et *in vivo* de la disponibilité de neurorécepteurs dans le cerveau, permettant effectivement d'étudier, la corrélation entre les caractéristiques biochimiques du

cerveau et le comportement. Cette possibilité a été mise à profit dans de nombreuses études de troubles neuropsychiatriques menées chez l'homme avec des instruments TEMP conventionnels, comme par exemple la dépression (Baeken, De Raedt et al. 2012; Ho, Ho et al. 2012), la schizophrénie (Schmitt, Dresel et al. 2012) ou les troubles de l'alimentation (Lundgren, Newberg et al. 2008). Pourtant, en dépit d'un potentiel comparable à celui démontré chez l'homme, la possibilité de l'imagerie TEMP sur des modèles animaux de pathologie neuropsychiatriques n'a encore guère été considérée, d'une part à cause de la relative nouveauté des scanners adaptés et d'autre part à cause du faible nombre de traceurs performants dans cette application.

1.5.1. Imagerie TEMP petit animal et barrière hémato encéphalique

Une des propriétés les plus critiques pour qu'un traceur soit utilisable en neuro-imagerie est bien évidemment sa pénétration cérébrale, c'est à dire sa capacité à traverser la BHE. En effet, les échanges entre le sang et le cerveau sont étroitement régulés (Abbott, Ronnback et al. 2006) et il a été démontré que de nombreuses molécules sont activement transportées vers la lumière des vaisseaux sanguins lorsqu'elles pénètrent dans les cellules endothéliales des capillaires cérébraux. Certaines protéines de transport responsables de ce phénomène ont été identifiées, notamment la protéine MDR1A (multi-drug resistance protein 1A) (Ohtsuki and Terasaki 2007), aussi appelée glycoprotéine-P (ou P-gp). Ces transporteurs sont membres de la superfamille de transporteurs ABC (Ohtsuki and Terasaki 2007) et se sont révélés être parmi les transporteurs majoritairement exprimés dans les capillaires cérébraux des rongeurs (Kamiie, Ohtsuki et al. 2008). Les transporteurs MDR1A sont également connus pour influencer sur les cinétiques de nombreux produits pharmaceutiques (Zhou 2008), faisant d'eux des cibles potentiellement intéressantes pour la modulation de la pharmacocinétique des traceurs

TEMP. De nombreux inhibiteurs pharmacologiques ont été développés afin de bloquer ces transporteur d'efflux (Akhtar, Ahad et al. 2011). Cependant une autre option est l'utilisation d'animaux dont le gène Mdr1a a été invalidé (Mdr1a knockout, ou KO). Cette dernière option offre l'avantage d'être une modification stable du système, ce qui pourrait se révéler être plus pratique qu'un blocage transitoire des transporteurs par des inhibiteurs compétitifs, lorsque l'objectif est d'étudier la pharmacocinétique des traceurs.

Il résulte de la rigueur des exigences posées sur la pharmacocinétique des traceurs pour la réussite de la neuro-imagerie TEMP chez le petit animal, que relativement peu de radiotraceurs efficaces soit connus. Et il n'existe actuellement aucun traceur TEMP efficace pour nombre de récepteurs à la sérotonine (Paterson, Kornum et al. 2013).

1.6. *Objectifs de l'étude*

Dans cette étude, nous présentons l'évaluation d'une sélection de traceurs sérotoninergiques à la fois chez des rats de type sauvage (WT) et Mdr1a KO, en effet, il est possible que certains traceurs aux performances non satisfaisantes pour l'imagerie TEMP chez le rat de type sauvage, voient leur pharmacocinétique modifiée de telle façon que l'imagerie TEMP de leur cible devienne possible chez le rat déficient en transporteur MDR1A.

Un certain nombre de traceurs TEMP des récepteurs sérotoninergiques ont été développés, avec des degrés de succès variables pour l'imagerie du petit animal, voir Paterson et al. (Paterson, Kornum et al. 2013). Dans cette étude, nos efforts ont été concentrés sur la sélection de traceurs décrits ci-après.

Le ^{123}I -p-MPPI, a montré un certain potentiel en tant que traceur des récepteurs 5-HT_{1A} dans des études *ex vivo in vitro* et chez le rongeur (Kung, Frederick et al. 1995) ainsi que *in vivo* chez le singe (Kung, Frederick et al. 1996). Le ^{123}I -R91150, est un ligand sélectif des récepteurs 5-HT_{2A} et a été utilisé avec succès pour l'imagerie TEMP chez l'homme (Busatto, Pilowsky et al. 1997). Le ^{123}I -SB207710, a démontré un certain potentiel en tant que traceur des récepteurs 5-HT₄ *in vitro* et *ex vivo* chez les rongeurs ainsi que *in vivo* chez des primates non humains (Pike, Halldin et al. 2003). Et enfin, le ^{123}I -ADAM, qui est un ligand sélectif du SERT (Choi, Hou et al. 2000) et a été utilisé avec succès dans des études TEMP humaines (Ho, Ho et al. 2012).

Dans cette étude, les radioligands ont été obtenus par radioiodation de leur précurseur respectif, la purification et la mesure de l'activité spécifique ont été effectuées par HPLC, et des évaluations préliminaires par autoradiographie *ex vivo* ont été réalisées pour obtenir des images de référence pour les données TEMP *in vivo*. Enfin, des acquisitions TEMP dynamiques ont été réalisées sur un scanner TEMP dédié au petit animal afin d'étudier le potentiel de chaque traceur pour l'imagerie chez les rats WT et Mdr1a KO.

2. Matériel et méthodes

2.1. Animaux

Les animaux utilisés étaient tous des rats mâles de souche Sprague Dawley, KO pour le gène *Mdr1a* (souche SD-*Abcb1*^{tm1sage}) et d'environ 300-350 g, ou des rats sauvages de même fond génétique pour les animaux contrôles (Sigma Advance Genetic Engineering Labs , USA). Les animaux déficients pour le gène *Mdr1a* sont des KO homozygotes et affichent une perte totale de la protéine par Western blot, selon le fournisseur. Les animaux ont été hébergés en groupe, avec des cycles lumière / obscurité de 12 heures / 12 heures, avec eau et nourriture ad libitum. Tous les protocoles expérimentaux sur les animaux ont été approuvés par l'Office vétérinaire cantonal suisse.

2.2. Produits chimiques

L'iode radioactif ¹²³I a été obtenu auprès de GE Healthcare, Eindhoven, Pays-Bas. Le précurseur triméthylstannyl du SB207710 et le précurseur tributylstannyl du p-MPPI ont été obtenus auprès de Eras Labo (Grenoble, France). Le précurseur tributylstannyl de l'ADAM a été obtenu auprès de Syntheval (Caen, France). Le précurseur du R91150 a été obtenu auprès du Centre d'Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN, Caen, France). Tous les autres produits chimiques ont été obtenus auprès de Sigma-Aldrich avec la plus grande pureté disponible et ont été utilisés sans purification supplémentaire.

2.3. Radiochimie

Tous les radiotraceurs utilisés ont été obtenus par incubation des mélanges réactionnels spécifiés ci-après. Les temps d'incubation étaient de 20 minutes à température ambiante. Les étapes de purification ont été réalisées directement à partir des mélanges réactionnels sur un système HPLC (Knauer GmbH, Allemagne) avec une colonne en phase inverse (Bondclone C18 10 μ m 300 x 7,8 mm, Phenomenex, Suisse), éluée avec les phases mobiles spécifiées ci-après, à un débit de 3 ml/min. Les fractions contenant le composé radiomarqué d'intérêt ont été recueillies, concentrées en utilisant un évaporateur rotatif et le produit final a été dilué dans du sérum physiologique avant administration à l'animal. Durant les étapes de purification HPLC, l'absorbance UV et la radioactivité éluées ont été suivies, permettant ainsi la mesure de l'activité spécifique grâce à des courbes d'étalonnage établies avec le composé de référence froid. L'activité spécifique des préparations étaient toujours au-dessus de 20% de l'activité spécifique intrinsèque de l'iode ^{123}I (c à d supérieure à 1760 MBq / nmol). Les puretés radiochimiques évaluées par HPLC, étaient toutes au-dessus de 98%.

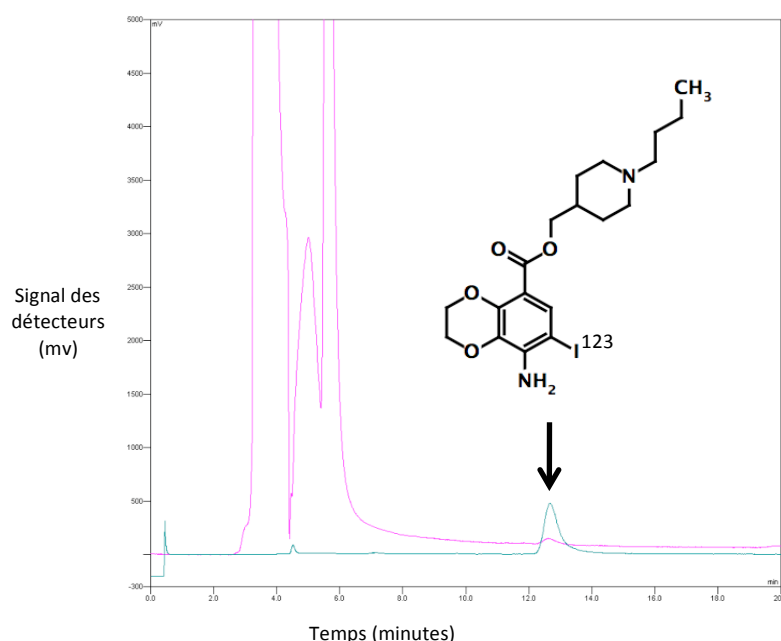


Figure 13 – Purification HPLC d'un radiotraceur. Exemple de chromatogramme HPLC lors de la préparation du traceur ^{123}I -SB207710. Absorbance UV (rose), radioactivité (bleu), structure du ^{123}I -SB207710, pic d'élution du ^{123}I -SB207710 (flèche)

2.3.1. ¹²³I-p-MPPI

50 µg de précurseur p-MPPI dans 50 µL d'éthanol ont été mélangés avec 50 µL de HCl 1 M, 15 µL d'iodure de sodium ¹²³I (10 mCi) dans une solution de NaOH 0,05 M et 50 µL de H₂O₂ 3%. La purification a été réalisée par HPLC avec un gradient de 10 minutes allant de 30 à 60% d'acétonitrile (ACN) dans l'eau avec 7 mM de H₃PO₄. Le temps de rétention du radiotraceur était de 8,8 minutes.

2.3.2. ¹²³I-R91150

300 µg de précurseur du R91150 dans 3 µL d'éthanol ont été mélangés avec 3 µL d'acide acétique glacial, 15 µL d'iodure de sodium ¹²³I (10 mCi) dans une solution de NaOH 0,05 M et 3 µL de H₂O₂ 30%. Le ¹²³I-R91150 a été isolé par HPLC isocratique (50/50 ACN/eau, avec 10 mM de tampon acide acétique/acétate à pH 5). Le temps de rétention du radiotraceur était de 11,0 minutes.

2.3.3. ¹²³I-SB207710

50 µg de précurseur du SB207710 dans 50 µL d'éthanol ont été mélangés avec 50 µL de HCl 1 M, 15 µL transporteur d'iodure de sodium ¹²³I (10 mCi) dans une solution de NaOH 0,05 M et 50 µL de H₂O₂ 3%. Le ¹²³I-SB207710 a été isolé par HPLC isocratique (ACN/eau 30/70, 7 mM H₃PO₄). Le temps de rétention du ¹²³I-SB207710 était de 12 minutes.

2.3.4. ¹²³I-ADAM

50 µg de précurseur de l'ADAM dans 5 µL d'éthanol ont été mélangés avec 5 µL de HCl 1 M, 15 µL d'iodure de sodium ¹²³I (10 mCi) dans une solution de NaOH 0,05 M et 5 µL de

H₂O₂ 30%. Le ¹²³I-ADAM a été isolé par HPLC isocratique (ACN/eau 60/40, avec 10 mM de tampon acide acétique/acétate à pH 5), temps de rétention: 12 minutes.

2.4. *Autoradiographies ex vivo*

Pour cette série d'expériences, des rats de type sauvage ont été anesthésiés par de l'isoflurane avant de recevoir une dose de 10 MBq de radiotracer par injection intra veineuse dans la veine caudale. Puis les animaux ont été sacrifiés par décapitation, soit 30 minutes après l'injection dans les cas du ¹²³I-SB207710 et du ¹²³I-p-MPPI, soit 60 minutes après dans les cas du ¹²³I-R91150 et du ¹²³I-ADAM. Les cerveaux ont rapidement été extraits et congelés dans l'isopentane pré-refroidi à -20 °C. Des coupes coronales de 20 micromètres d'épaisseur ont été recueillies avec un cryomicrotome (Leica) à -20 ° C. Les sections ont été montées sur des lames de verre, séchées à l'air à température ambiante, et exposées sur des écrans radio luminescents à mémoire (ERLM) (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japon). Enfin, les images autoradiographiques ont été lues avec une résolution de 50 µm sur un scanner à ERLM (Fuji Bio-Imaging Analyzer BAS 1800II scanner, Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japon).

2.5. *Acquisitions TEMP dynamiques*

Les animaux ont été maintenus sous anesthésie à l'isoflurane (1,8-2,5%) dans l'oxygène pur et installés dans un système d'imagerie TEMP miniaturisé (U-SPECT-II, MILABS, Pays-Bas). Les animaux ont ensuite reçu une injection en bolus, dans la veine caudale, de 55 MBq de traceur radiomarké à l'iode ¹²³I dissout dans 0,6 ml de solution saline. Le système d'imagerie était équipé d'un collimateur à usage général pour rat et souris (GP-RM, 75 sténopés de 1,5 mm de diamètre). Le champ d'acquisition a été limité au minimum autour du

crâne, et une série d'images d'une durée de 1 minute a été acquise. En fin d'examen, un fantôme constitué d'un tube de 2 mL contenant une concentration connue de radioactivité a été scanné dans les mêmes conditions en vue de convertir les mesures en activité par unité de volume. Des images tomographiques d'une résolution de $0.4 \times 0.4 \times 0.4 \text{ mm}^3$ ont été reconstruites par l'algorithme de reconstruction P-OSEM (pixel ordered subset expectation maximisation, 4 itérations avec 6 sous-ensembles) (Branderhorst, Vastenhouw et al. 2010). Les images obtenues ont ensuite été lissées par l'application d'un filtre gaussien de 0,8 mm FWHM. Les données ont été corrigées pour la décroissance radioactive, mais aucune correction de l'atténuation ni de la diffusion n'a été appliquée.

2.6. *Coregistration des données et analyse*

Les données TEMP ont été analysées avec le logiciel PMOD (PMOD Technologies, Zurich, Suisse). Les images ont été recalées manuellement sur un atlas du cerveau de rat (Schiffer, Mirrione et al. 2006).

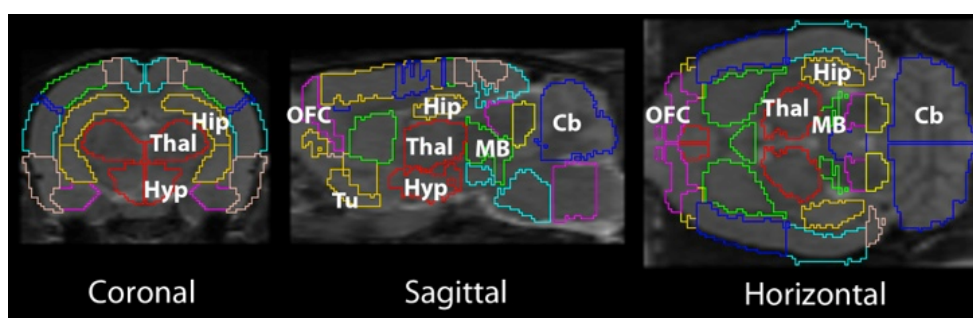


Figure 14 – Atlas digital du cerveau de rat. Vues en coupe de l'atlas de Schiffer (Schiffer, Mirrione et al. 2006), superposé à une IRM du cerveau de rat. Hip, hippocampe ; Thal, thalamus ; Hyp, hypothalamus ; Tu, tubercules olfactifs ; OFC, cortex orbitofrontal ; MB, mésencéphale ; Cb, cervelet

Cet atlas définit une multitude de régions d'intérêt (ROIs) pour chacune desquelles une cinétique locale a été extraite des données TEMP. Les ROIs de l'atlas allant par paire (exemple : cortex frontal gauche et cortex frontal droit) ont été considérées comme une seule région, de même que les sous-régions de l'hippocampe (Hip) et du cervelet (Cb) qui ont également été réunies : ci-après, Hip fera référence à la combinaison des régions antérieure et postérieure de l'hippocampe et Cb se référera à la combinaison des régions définies dans l'atlas comme matière grise et matière blanche du cervelet.

Traceur	Cible	Région riche	Région pauvre
123I-p-MPPI	5-HT _{1A}	Hippocampe (Hip)	Cervelet (Cb)
123I-R91150	5-HT _{2A}	Cortex Orbitofrontal (OFC)	Cervelet (Cb)
123I-SB207710	5-HT ₄	Tubercules olfactifs (Tu)	Cervelet (Cb)
123I-ADAM	SERT	Mésencéphale (MB)	Cervelet (Cb)

Tableau 2 – Traceurs à l'étude. Tableau récapitulatif des traceurs, de leur principale région cible et de leur région de référence

Afin d'évaluer les performances des différents traceurs et de les comparer entre les animaux de type sauvage ou KO, une estimation du potentiel de liaison non déplaçable (non-displaceable binding potential ou BP_{ND}) (Innis, Cunningham et al. 2007) a été calculée en faisant le rapport, à l'équilibre, entre l'activité moyenne dans une région riche en récepteurs cibles du traceur et l'activité moyenne dans une région pauvre en récepteurs cibles, moins un. Tous les traceurs étudiés ici sont très faiblement présents dans le cervelet, qui servira donc de région de référence pour chacun d'entre eux. Les régions choisies pour les calculs de BP_{ND} sont énumérées dans le Tableau 2.

2.7. Modélisation de la pharmacocinétique du ^{123}I -R91150

Dans le cas du ^{123}I -R91150, les données de distribution du traceur au cours du temps ont été analysées par modélisation pharmacologique avec la méthode SRTM (Lammertsma and Hume 1996). La SRTM va nous permettre de caractériser de façon plus précise la pharmacocinétique du R91150 afin de mieux comprendre l'effet des transporteurs MDR1A sur la distribution *in vivo* de ce traceur. L'optimisation des paramètres du modèle, afin de minimiser l'écart par rapport aux données expérimentales, a été réalisée avec le logiciel PMOD (PMOD Technologies, Zurich, Suisse), pour toutes les régions d'intérêt de l'atlas à l'exception du cervelet qui était pour sa part la région de référence. Le BP_{ND} obtenu par la SRTM sera ici nommé BP_{ND} SRTM pour éviter les confusions avec le BP_{ND} obtenu par la méthode de l'équilibre.

3. Résultats

3.1. ¹²³I-pMPPI

L'évaluation du ¹²³I-pMPPI par autoradiographie *ex vivo* chez le rat WT (Figure 15 D), a montré une forte accumulation de radioactivité dans les régions de l'hippocampe et du septum, ainsi que, mais de façon un peu plus modeste, dans les régions de l'amygdale, de l'hypothalamus et dans les régions corticales en général. Le cervelet au contraire, a montré un faible niveau d'accumulation de radioactivité.

Traceurs	WT BP _{ND}		KO BP _{ND}		P value	Région cible /Région de référence
	Mean ± SD	n	Mean ± SD	n		
¹²³ I-p-MPPI	0.493 ± 0.253	4	0.887 ± 0.524	4	0.224	Hip / Cb
¹²³ I-R91150	1.221 ± 0.261	4	3.981 ± 0.648	4	<0.002	OFC / Cb
¹²³ I-SB207710	0.087 ± 0.032	3	0.111 ± 0.055	2	0.568	Tu / Cb
¹²³ I-ADAM	1.271 ± 0.018	4	1.311 ± 0.085	4	0.393	MB / Cb

Tableau 3 – BP non déplaçables à l'équilibre. Tableau comparatif entre les animaux WT et Mdr1a KO. Valeur p issues d'un test t non apparié.

Quant à la comparaison des résultats *in vivo* entre les deux souches de rats, elle a révélé un contraste d'image légèrement supérieur chez les animaux KO (Figure 15 C) par rapport aux animaux non mutés (Figure 15 B), comme en témoigne le BP_{ND} calculé dans l'hippocampe, par rapport au cervelet (Tableau 3). En effet le BP_{ND} était très petit chez les animaux WT (0,49 ± 0,25, moyenne ± écart-type) et était plus élevé, sans être pour autant significativement différent chez les animaux KO (0,89 ± 0,52, moyenne ± écart-type, p = 0,224). Les cinétiques observées dans l'hippocampe des deux souches (Figure 15 E) ont montré que la pénétration cérébrale du ¹²³I-p-MPPI avait approximativement doublé chez les rats KO, cependant la

clairance cérébrale est restée rapide dans les deux cas, et les niveaux d'activité observés dans l'hippocampe, région pourtant riche en récepteur 5-HT_{1A}, ont rapidement convergé, en moins d'une heure, vers ceux observés dans le cervelet, qui est lui une région presque dépourvue de récepteur 5-HT_{1A}.

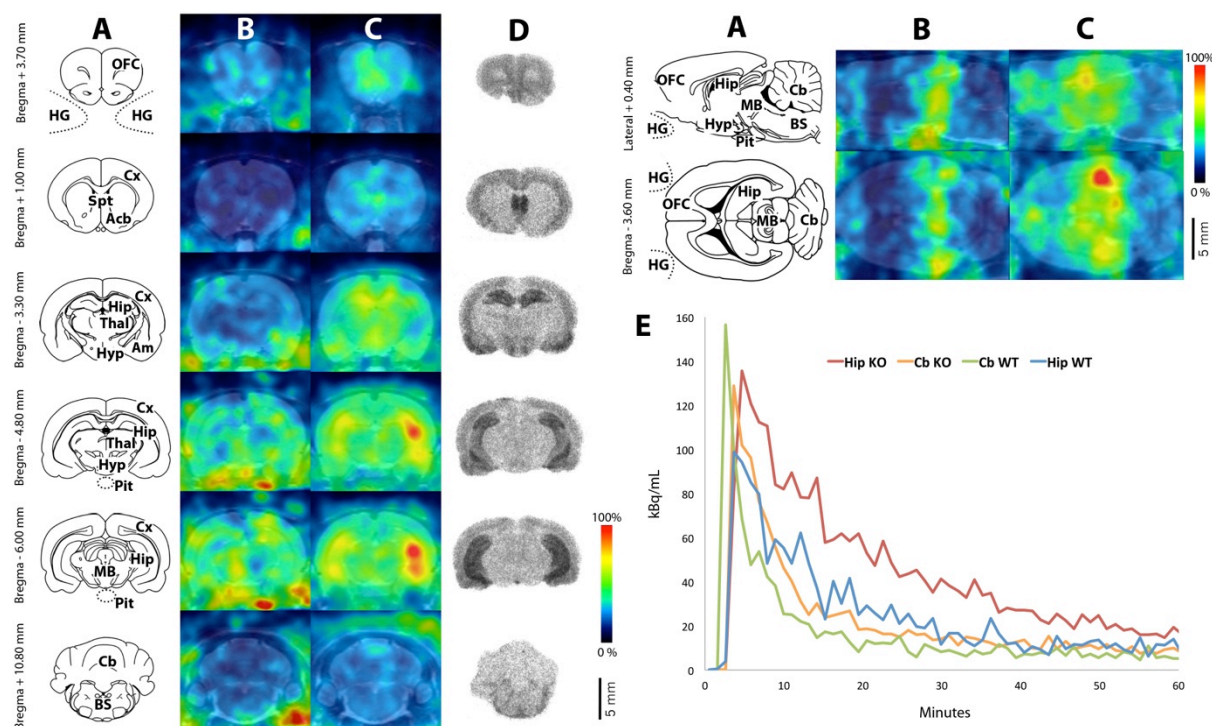


Figure 15 - Etude de la distribution cérébrale *in vivo* du ¹²³I-p-MPPI. Schémas anatomiques adaptés de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos 2004) (A), images TEMP moyennes obtenues entre les temps +15 et +35 minutes après l'injection du traceur chez un rat WT (B) et chez un rat KO (C), autoradiogrammes *ex vivo* obtenus chez un animal WT sacrifié 30 minutes après injection du traceur (D), exemples de cinétiques cérébrales régionales mesurées par TEMP dans des régions riche (Hip) et pauvre (Cb) en 5-HT_{1A} chez les deux souches de rats (E)

3.2. ¹²³I-R91150

L'évaluation du ¹²³I-R91150 par autoradiographie *ex vivo* chez le rat WT (figure 16 D), a montré une forte accumulation d'activité dans les régions frontales comme l'OFC et une accumulation plus modérée dans le reste du cortex, le mésencéphale et l'hypothalamus. Au

contraire, le cervelet a montré un très faible niveau d'accumulation d'activité. L'évaluation *in vivo* par imagerie TEMP chez le rat WT, a montré une faible pénétration cérébrale du ^{123}I -R91150 et une accumulation de signal plus prononcée dans la glande pituitaire (Pit) ou les glandes de Harder (HG) (figure 16 B). Chez les animaux KO cependant, les images TEMP ont mis en évidence une forte accumulation d'activité dans les régions frontales et le reste du cortex, et relativement peu d'accumulation dans le cervelet (figure 16 C). Les cinétiques observées dans différentes régions d'intérêt montrent de profondes différences entre les animaux KO et WT, avec une augmentation de la pénétration cérébrale d'un facteur trois environ dans la région de l'OFC chez le rat KO (figure 16 E).

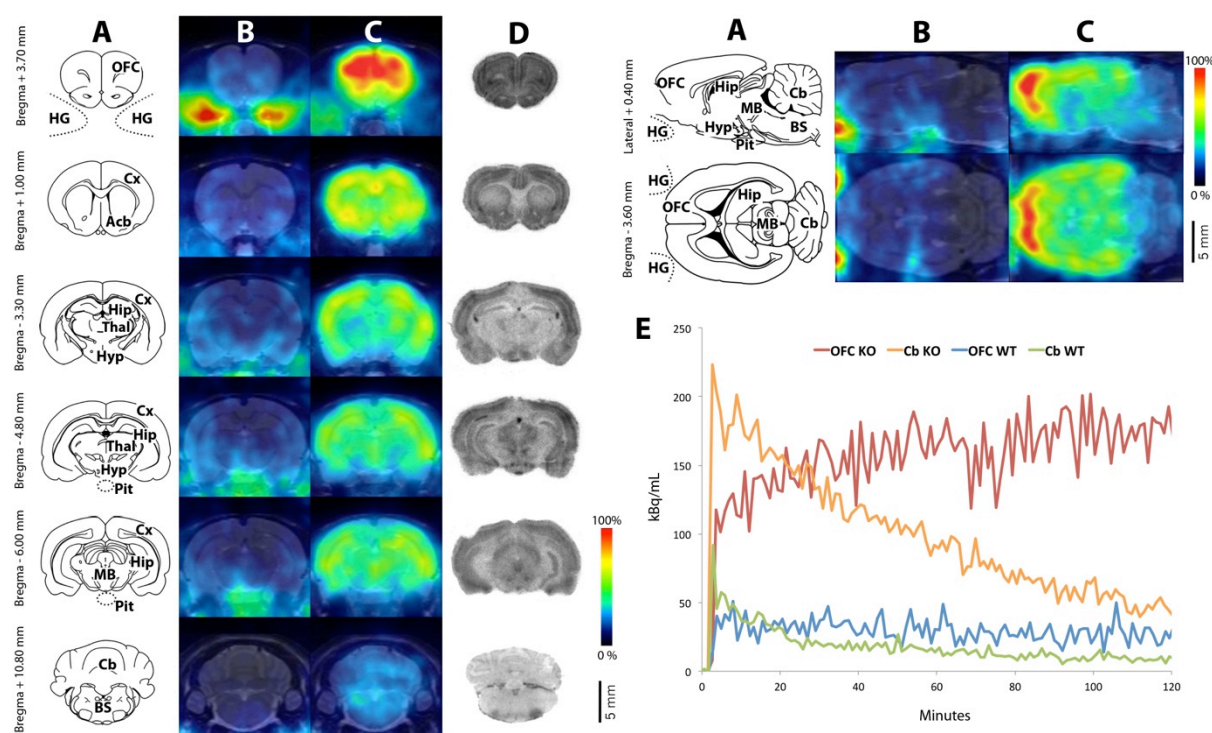


Figure 16 - Etude de la distribution cérébrale *in vivo* du ^{123}I -R91150. Schémas anatomiques adaptés de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos 2004) (A), images TEMP moyennes obtenues entre les temps +100 et +120 minutes après l'injection du traceur chez un rat WT (B) et chez un rat KO (C), autoradiogrammes *ex vivo* obtenus chez un animal WT sacrifié 60 minutes après injection du traceur (D), exemples de cinétiques cérébrales régionales mesurées par TEMP dans des régions riche (OFC) et pauvre (Cb) en 5-HT_{2A} chez les deux souches de rats (E)

Le BP_{ND} calculé pour le ¹²³I-R91150 dans la région de l'OFC contre le cervelet (tableau 3) était modeste chez les rats WT (1,22 ± 0,26, moyenne ± écart-type) et était significativement plus élevé chez les rats KO (3,98 ± 0,65, moyenne ± écart-type, p <0,002). L'effet des transporteurs MDR1A sur la cinétique du ¹²³I-R91150 était également apparent dans la variation des paramètres SRTM obtenus pour la région de l'OFC avec le cervelet comme référence. En effet, le tableau 4 montre, à l'image du BP_{ND} à l'équilibre, une augmentation du BP_{ND} SRTM d'un facteur trois environ, chez les animaux KO par rapport aux WT. Cependant, aucune variation significative n'a été observée entre les deux souches d'animaux au niveau des taux d'efflux du cerveau (k₂) ou des rapports des taux d'entrée dans le cerveau (R₁).

Paramètres	WT	Mdr1a KO	p value
SRTM	(n=4)	(n=4)	
	Mean ± SD	Mean ± SD	
R1	0.487 ± 0.033	0.525 ± 0.064	0.332
k₂ (min⁻¹)	0.046 ± 0.003	0.042 ± 0.003	0.108
BP_{ND} SRTM	0.959 ± 0.039	2.656 ± 0.234	< 0.001

Tableau 4 - Paramètres pharmacocinétiques SRTM du ¹²³I-R91150. Comparaison entre les souches de rats WT et Mdr1a KO dans la région de l'OFC, avec le cervelet pour référence. Valeur p d'un test t non apparié.

L'application de la SRTM à d'autres régions d'intérêt a également révélé que les BP_{ND} SRTM étaient pour la plupart nettement supérieurs chez les rats KO (figure 17) à l'exception de ceux observés dans les régions du cortex entorhinal et de l'hypothalamus qui étaient plus élevés chez les rats WT par rapport aux animaux KO. Dans l'ensemble, les données TEMP *in*

in vivo obtenues avec le ^{123}I -R91150 chez le rat KO (figure 16 C) étaient visuellement remarquablement bien corrélées avec les données observées par autoradiogrammes *ex vivo* (figure 16 D), tandis que les images TEMP obtenues chez le rat WT étaient dominées par l'accumulation d'activité dans les glandes de Harder et dans la glande pituitaire (figure 16 B).

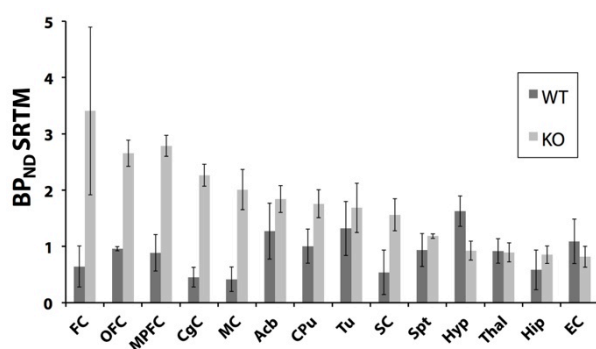


Figure 17 - Potentiels de liaison non déplaçables du ^{123}I -R91150 (moyenne \pm déviation standard), obtenus par modélisation avec la SRTM chez des rat WT (n = 4) et Mdr1a KO (n = 4)

3.3. ^{123}I -SB207710

L'évaluation du ^{123}I -SB207710 par autoradiographie *ex vivo* chez le rat WT (Figure 18 D), a montré une forte accumulation d'activité dans les tubercules olfactifs et le globus pallidus, ainsi que, mais dans une moindre mesure, l'hypothalamus, le noyau accumbens, noyau caudé putamen, et l'hippocampe. Au contraire, le cervelet a montré un très faible niveau d'accumulation de radioactivité. L'évaluation *in vivo* du ^{123}I -SB207710 par imagerie TEMP n'a pratiquement montré aucun signal spécifique dans le cerveau et ce indifféremment chez le rat WT (Figure 18 B) ou Mdr1a KO (Figure 18 C). Dans le tableau 3, le BP_{ND} calculé dans la région des tubercules olfactifs contre le cervelet était négligeable chez les rats WT ($0,09 \pm 0,03$ moyenne \pm écart-type) et non significativement différent de celui observé chez les rats Mdr1a KO ($0,11 \pm 0,06$ moyenne \pm écart-type, $p = 0,568$). Par ailleurs, les cinétiques des différentes régions d'intérêt sont restées pratiquement indiscernables les unes des autres (Figure 18 E). Une expérience complémentaire visant à étudier l'effet du métabolisme sur les performances du ^{123}I -SB207710 (figure 19) a montré que la disponibilité cérébrale de ce

traceur peut être augmentée de façon très marquée chez le rat WT par un prétraitement avec un inhibiteur des estérases (ici le dichlorvos ou DDVP).

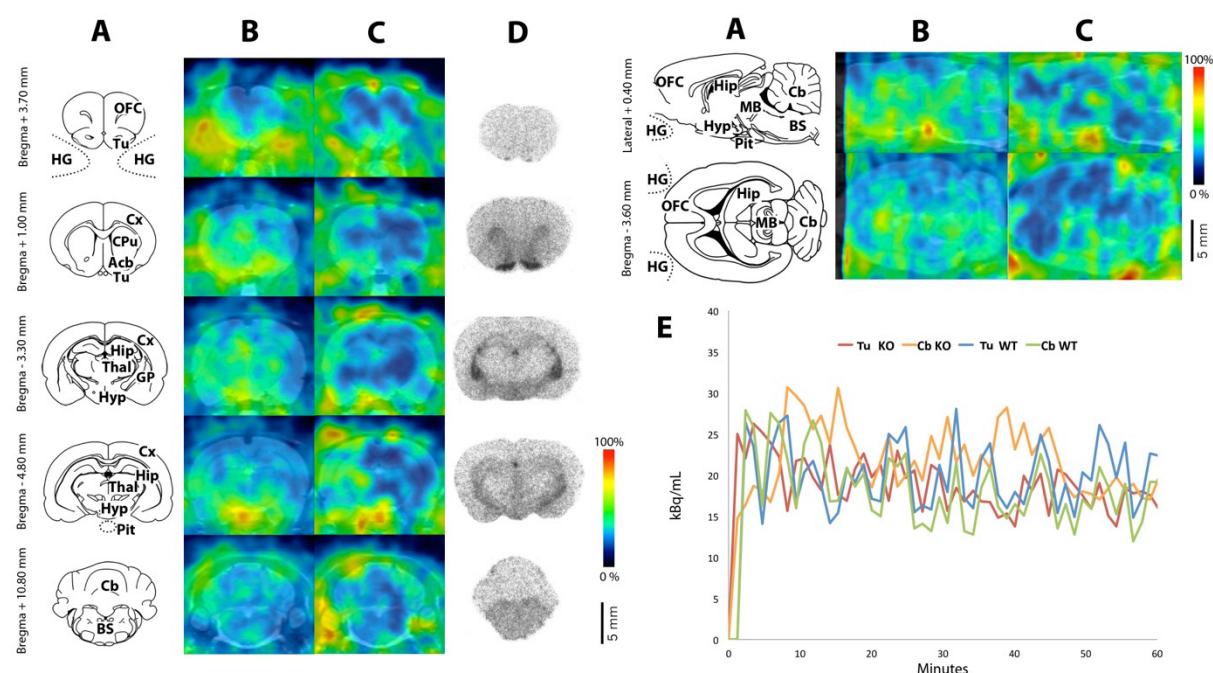


Figure 18 - Etude de la distribution cérébrale *in vivo* du ^{123}I -SB207710. Schémas anatomiques adaptés de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos 2004) (A), images TEMP moyennes obtenues entre les temps +30 et +60 minutes après l'injection du traceur chez un rat WT (B) et chez un rat KO (C), autoradiogrammes *ex vivo* obtenus chez un animal WT sacrifié 30 minutes après injection du traceur (D), exemples de cinétiques cérébrales régionales mesurées par TEMP dans des régions riche (Tu) et pauvre (Cb) en 5-HT₄ chez les deux souches de rats (E)

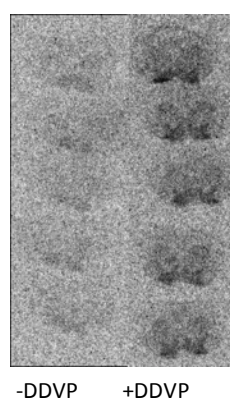


Figure 19 – Expérience d'inhibition du métabolisme du ^{123}I -SB207710. Autoradiogrammes *ex vivo* de sections cérébrales coronales réalisées au niveau du noyau accumbens et des tubercules olfactifs, 30 minutes après injection de ^{123}I -SB207710 chez le rat WT, prétraité par un inhibiteur des estérases (+DDVP) ou sans traitement préalable (-DDVP)

3.4. ^{123}I -ADAM

L'évaluation du ^{123}I -ADAM par autoradiographie *ex vivo* chez le rat WT (Figure 20 D), a montré une forte accumulation de radioactivité dans l'hypothalamus et le mésencéphale, ainsi que, mais dans une moindre mesure, dans de nombreuses autres régions, dont notamment les tubercules olfactifs, le septum, le thalamus, l'hippocampe, le globus pallidus et le pons. Au contraire de ces régions, le cervelet a montré un très faible niveau d'accumulation de radioactivité.

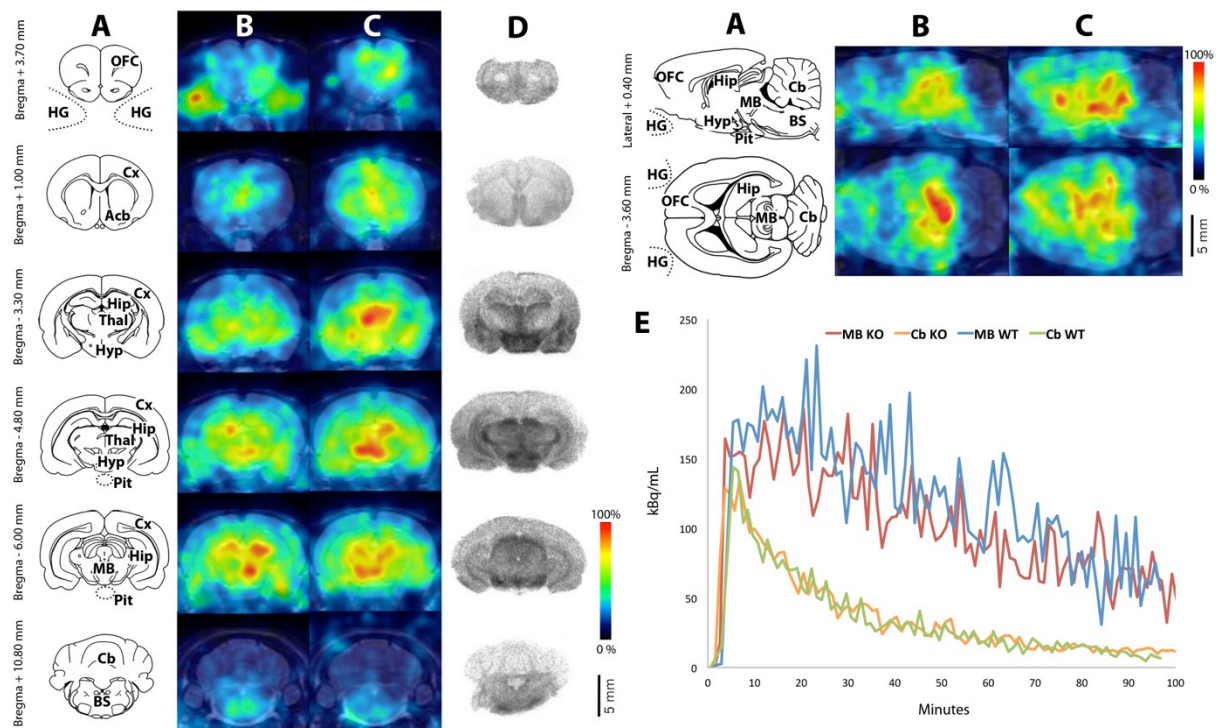


Figure 20 - Etude de la distribution cérébrale *in vivo* du ^{123}I -ADAM. Schémas anatomiques adaptés de l'atlas de Paxinos et Watson (Paxinos 2004) (A), images TEMP moyennes obtenues entre les temps +70 et +90 minutes après l'injection du traceur chez un rat WT (B) et chez un rat KO (C), autoradiogrammes *ex vivo* obtenus chez un animal WT sacrifié 60 minutes après injection du traceur (D), exemples de cinétiques cérébrales régionales mesurées par TEMP dans des régions riche (MB) et pauvre (Cb) en SERT chez les deux souches de rats (E)

L'évaluation du ^{123}I -ADAM par TEMP, a montré une entrée importante du traceur dans le cerveau, et à des niveaux d'intensité similaire chez les animaux WT (Figure 20 B) et les animaux KO (Figure 20 C), avec une accumulation préférentielle dans l'hypothalamus et le mésencéphale, ainsi qu'une faible accumulation dans le cervelet, ce qui est en conformité avec les autoradiogrammes obtenus *ex vivo* (Figure 20 D). Le BP_{ND} calculé dans le mésencéphale contre le cervelet (tableau 3) était modéré chez les rats WT ($1,27 \pm 0,02$ moyenne \pm écart-type) et non significativement différent de celui observé chez les rats *Mdr1a* KO ($1,31 \pm 0,09$ moyenne \pm écart-type, $p = 0,393$). De plus, les cinétiques observées pour le ^{123}I -ADAM (Figure 20 E) ne montraient pas de différence claire entre les deux souches d'animaux.

4. Discussion

4.1. ^{123}I -pMPPI

Les résultats autoradiographiques *ex vivo* obtenus avec le traceur des récepteurs 5-HT_{1A}, le ^{123}I -p-MPPI, sont en accord avec les données de la littérature (Kung, Frederick et al. 1995), mais la qualité des données TEMP *in vivo* a été limitée par la clairance cérébrale rapide de ce traceur. Les cinétiques observées dans diverses régions d'intérêt montrent néanmoins un motif de distribution coïncidant avec celle observée *ex vivo*, avec notamment une plus grande accumulation de signal dans l'hippocampe par rapport au cervelet. Il est remarquable qu'un traceur analogue du ^{123}I -p-MPPI utilisé pour l'imagerie TEP, le ^{18}F -MPPF, ait lui été utilisé avec un plus grand succès pour l'imagerie des récepteurs 5-HT_{1A} chez le petit animal (Moulin-Sallanon, Charnay et al. 2009), cette meilleure réussite est probablement à mettre sur le compte de la plus grande sensibilité de la TEP par rapport à la TEMP. De plus, des études de distribution par autoradiographie *ex vivo* menées par d'autres groupes ont signalé une multiplication de la pénétration cérébrale du ^{18}F -MPPF par un facteur deux à trois lors de son administration à des souris KO pour le gène *Mdr1a* (Passchier, van Waarde et al. 2000). Nos données TEMP *in vivo* montrent une augmentation similaire de la captation cérébrale du ligand ^{123}I -p-MPPI iodé chez les rats *Mdr1a* KO, indiquant que ce ligand, qui ne diffère du ^{18}F -MPPF que par son radionucléide, fait l'objet d'un transport par les protéines d'efflux MDR1A, tout comme son analogue TEP. Toutefois, la pénétration cérébrale accrue observée chez les animaux KO n'aura pas permis d'améliorer significativement le contraste observé entre les régions riches et pauvres en récepteur cible, et les données obtenues sont restées très bruitées. L'utilisation de ce traceur pour la quantification du récepteur 5-HT_{1A} par l'imagerie TEMP chez le petit animal est donc compromise, à la fois chez les rats de type WT et de

type Mdr1a KO. Le faible temps de séjour du traceur dans les régions riches en récepteur cible pourrait s'expliquer par une constante cinétique de dissociation (k_d) élevée.

4.2. ^{123}I -R91150

Le ligand du récepteur 5-HT_{2A}, le traceur ^{123}I -R91150, a présenté une distribution *ex vivo* en accord avec la littérature (Lopez-Gimenez, Mengod et al. 1997), avec notamment une forte accumulation dans le cortex, et en particulier dans les régions corticales frontales. La pénétration cérébrale de ce traceur a été faible chez les animaux WT par rapport aux animaux KO, chez lesquels la cinétique du traceur était radicalement modifiée, avec une augmentation d'un facteur trois environ de la concentration cérébrale en traceur dans la région de l'OFC. De façon un peu surprenante, la comparaison des paramètres pharmacocinétiques SRTM obtenus pour le ^{123}I -R91150 chez les rats WT et Mdr1a KO n'a montré aucune variation significative du taux d'efflux du traceur à partir du tissu cérébral (k_2): en effet, compte tenu de la fonction des protéines MDR1A, consistant à transporter des substrats en dehors du tissu cérébral, une diminution de la valeur du k_2 chez les animaux KO aurait pu être attendue. Cependant, d'autres études ont suggéré que les protéines MDR1A ont la capacité d'expulser des substrats directement à partir de la membrane plasmique (Kannan, John et al. 2009) et donc d'interférer simultanément avec le taux d'entrée (K_1) et le taux d'efflux (k_2) des tissus. De plus, l'échelle à laquelle ces transporteurs d'efflux agissent au niveau moléculaire est beaucoup plus rapide que la résolution temporelle de l'acquisition TEMP (qui était ici de l'ordre d'une image par minute) (Muzi, Mankoff et al. 2009), ce qui rend impossible de distinguer complètement entre une baisse du k_2 et une augmentation de K_1 . Ainsi, il est plausible que l'absence des transporteurs MDR1A induise principalement une augmentation de K_1 et ceci expliquerait pourquoi aucune modification significative du k_2 n'est détectée lorsque l'on compare les

animaux KO et WT. Cependant, la SRTM ne permet pas d'accéder directement au K_1 mais uniquement au rapport R_1 entre les K_1 de la région d'intérêt et de celle de référence ($R_1 = K_1 / K_1'$). Dans notre cas, nous n'avons observé aucune variation de la valeur de R_1 entre les conditions KO et WT, ce qui indique que les taux d'entrée dans les deux régions sont affectés d'une manière proportionnellement similaire par la présence des MDR1A. Cette observation est en accord avec les travaux de Seegers et al. (Seegers, Potschka et al. 2002) qui ont montré que les transporteurs MDR1A sont exprimés à des niveaux comparables dans le cortex frontal et le cervelet. Néanmoins, les cinétiques observées ont clairement montré que la pénétration du traceur était supérieure à la fois dans le cervelet et l'OFC des rats KO, ce qui suggère fortement une augmentation des K_1 dans l'état KO. D'autres expériences de modélisation pharmacocinétique avec prélèvement de sang et dosage de la concentration plasmatique en traceur seront nécessaires pour quantifier précisément l'impact de l'expression de la protéine MDR1A sur le taux de pénétration des tissus cérébraux (K_1). Enfin, les valeurs de BP_{ND} SRTM étaient plus élevées dans la plupart des régions chez le rat *Mdr1a* KO par rapport aux WT, sauf dans le cas des régions voisines des glandes de Harder et de la glande pituitaire. En effet, la forte accumulation d'activité dans ces régions chez les animaux WT, combinée à la résolution limitée du scanner, ont conduit à des effets de débordement flagrants (« activity spillover »). Ainsi les BP_{ND} SRTM enregistrés dans le cortex entorhinal et l'hypothalamus des animaux WT ont été artificiellement augmentés de par leur proximité avec ces régions extra-cérébrales de forte accumulation de radioactivité. Néanmoins, ces régions mises à part, nos données montrent clairement que le signal cérébral donné par le ^{123}I -R91150 est limité par son taux d'entrée K_1 .

La grande différence observée dans la distribution du ^{123}I -R91150 chez les rats *Mdr1a* KO et WT suggère également que ce traceur pourrait être un outil intéressant pour quantifier l'activité des transporteurs MDR1A *in vivo*. En effet, le ^{123}I -R91150 a déjà été utilisé chez

l'homme dans plusieurs études (Paterson, Kornum et al. 2013) et il a été rapporté ne subir qu'une faible métabolisation (Catafau, Danus et al. 2006). De plus, nous avons rapporté ici une forte augmentation du signal cérébral chez les animaux KO Mdr1a et d'autres encore ont signalé une multiplication par cinq de l'accumulation cérébrale de ce traceur, avec l'utilisation de 50 mg / kg de cyclosporine A comme inhibiteur des protéines MDR1A (Blanckaert, Burvenich et al. 2009). Selon les critères définis par Kannan et al. (Kannan, John et al. 2009), ces propriétés suggèrent que le ^{123}I -R91150 serait un traceur TEMP adapté pour quantifier l'activité des protéines d'efflux *in vivo* chez l'homme. Aujourd'hui, l'évaluation de la fonction des protéines d'efflux attire de plus en plus d'attention en tant que moyen de prédire la réponse à certains traitements pharmacologiques, notamment les thérapies anticancéreuses, et également comme moyen d'étudier les rôles physiologiques de la BHE (Mairinger, Erker et al. 2011). Ainsi, l'évaluation de la fonction des transporteurs MDR1A pourrait un jour être utile pour la pratique clinique. Actuellement, de telles études sont généralement réalisées avec des traceurs TEP, le plus souvent à l'aide du ^{11}C -vérapamil (De Bruyne, Wyffels et al. 2010), mais la possibilité de faire ces examens en TEMP pourrait se révéler plus pratique, les scanners TEMP étant plus répandus, et l'approvisionnement en traceur potentiellement plus simple dans le cas de la TEP.

Dans l'ensemble, nos données pour le ^{123}I -R91150 montrent que, la quantification *in vivo* des récepteurs 5-HT_{2A} chez les animaux WT est compromise par la faible pénétration cérébrale et par la forte accumulation d'activité qui se produit dans les glandes de Harder et la glande pituitaire, induisant des effets de débordement sur les régions cérébrales voisines et faussant les résultats de la quantification. En revanche, les données TEMP chez le rat Mdr1a KO correspondent remarquablement bien avec les autoradiogrammes obtenus *ex vivo*, et permettent une quantification plus fiable des récepteurs 5-HT_{2A}.

4.3. ¹²³I-SB207710

Les autoradiogrammes *ex vivo* obtenus avec le traceur ¹²³I-SB207710 sont en accord avec les résultats trouvés dans la littérature (Vilaro, Cortes et al. 2005), et montrent une forte accumulation dans les régions reconnues riches en récepteurs 5-HT₄, cependant les essais d'imagerie TEMP avec ce traceur sont restés infructueux chez les rats KO Mdr1a comme chez les rats WT. Toutefois, le signal cérébral enregistré dans les deux cas n'était pas significativement différent du bruit de fond et il ne faut donc pas nécessairement en conclure que les transporteurs MDR1A n'aient aucun effet sur la cinétique de ce traceur. Il a été observé que l'analogue TEP du ¹²³I-SB207710, le ¹¹C-SB207145 était rapidement métabolisé dans le plasma humain et que cette dégradation était empêchée par les inhibiteurs d'estérase plasmatiques (Marner, Gillings et al. 2009). Le ¹²³I-SB207710 et son analogue TEP sont tous deux des esters et, dans une expérience *ex vivo*, nous avons observé une multiplication par trois de la concentration cérébrale de ce traceur chez le rat après prétraitement avec des inhibiteurs d'estérase plasmatiques (Figure 19). Il semble donc que la faible disponibilité cérébrale de ce traceur s'explique avant tout par sa rapide métabolisation par les estérases plasmatiques, avant une possible limitation par l'efflux dû aux protéines MDR1A. En conséquence de quoi, la quantification des récepteurs 5-HT₄ chez le petit animal par imagerie TEMP s'est révélée impossible, avec le ¹²³I-SB207710.

4.4. ¹²³I-ADAM

Le traceur ¹²³I-ADAM du transporteur à la sérotonine a donné des résultats d'autoradiographie *ex vivo* en accord avec la littérature (Choi, Hou et al. 2000), avec une forte liaison notamment dans le thalamus et l'hypothalamus, ainsi que dans d'autres régions du cerveau connues pour être riches en neurones sérotoninergiques (Charnay and Leger 2010).

Les images TEMP ont montré une pénétration cérébrale suffisante pour permettre l'enregistrement d'images significatives à la fois chez les animaux WT et KO pour le gène Mdr1a. Aucune différence significative dans pharmacocinétique du ^{123}I -ADAM n'a été observée entre les rats Mdr1a KO et WT, indiquant que ce traceur n'est probablement pas un substrat de ces transporteurs. Au final cependant, le ^{123}I -ADAM a montré une disponibilité cérébrale et des cinétiques favorables pour l'imagerie TEMP à la fois chez les animaux WT et KO Mdr1a.

5. Conclusion

LA TOMOGRAPHIE D'EMISSION MONOPHOTONIQUE CHEZ LE PETIT ANIMAL :
APPLICATION A L'IMAGERIE DES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES CENTRAUX

CONCLUSION

La tomographie d'émission monophotonique (TEMP, ou SPECT en anglais) est basée sur l'utilisation de molécules radiomarquées (ou traceurs), ayant une affinité pour une cible donnée ou ayant un devenir métabolique particulier. En permettant le suivi de la distribution d'un traceur après injection à un organisme, la TEMP autorise l'étude *in vivo* de cibles ou de processus biologiques dynamiques. Ainsi l'utilisation de ligands des récepteurs membranaires des neurotransmetteurs, en tant que traceur TEMP, peut permettre de quantifier *in vivo* les densités de neurorécepteurs disponibles dans le cerveau. L'intérêt en neuropsychologie est considérable, puisqu'il devient possible d'envisager de corrélérer un déficit cognitivo-comportemental précis à une anomalie spécifique d'un système neurotransmetteur.

L'utilisation de la TEMP chez le petit animal de laboratoire est devenue possible durant la dernière décennie, grâce au développement de systèmes d'imagerie nucléaire miniaturisés, ayant une résolution spatiale et une sensibilité de détection compatibles avec l'imagerie chez le rat et la souris.

La sérotonine (5-HT) joue un rôle majeur dans la régulation de nombreuses fonctions physiologiques et les dysfonctions du système sérotoninergique ont été impliquées dans des troubles neuropsychiatriques comme la schizophrénie, la dépression ou encore l'anorexie. Cependant, il existe plusieurs dizaines de récepteurs à la sérotonine et les rôles individuels de chacun d'entre eux ne sont pas encore précisément connus.

L'objectif de notre étude était d'évaluer de façon prospective le potentiel de radioligands de certains récepteurs à la sérotonine, dans le but ultérieur de quantifier ces récepteurs *in vivo* chez le rat par la méthode de la TEMP.

Dans cette étude, les traceurs ont été évalués à la fois chez le rat de type sauvage ainsi que déficient en transporteur MDR1a (ou glycoprotéine P). En effet, l'utilisation de cette souche d'animaux génétiquement modifiés, présentant une barrière hémato-encéphalique plus permissive, est susceptible d'entraîner une amélioration des capacités d'imagerie pour certains traceurs TEMP.

Nos investigations se sont portées sur quatre radioligands potentiellement utilisables comme traceurs TEMP. D'après la littérature, le ^{123}I -p-MPPI et le ^{123}I -SB207710 ont montré des résultats encourageants dans des études *in vitro* et *ex vivo* chez le rat et la souris en tant que traceurs des récepteurs 5-HT_{1A} et 5-HT₄ respectivement. De même, les ligands ^{123}I -R91150 et ^{123}I -ADAM qui ciblent respectivement les

récepteurs 5-HT_{2A} et le transporteur de la sérotonine (SERT), ont montré des propriétés propices à l'imagerie TEMP chez l'animal et ont été utilisés avec succès dans des études TEMP chez l'homme.

D'après nos résultats, les traceurs tels que le ¹²³I-SB207710 et le ¹²³I-p-MPPI sont des outils performants pour les études autoradiographiques *ex vivo* et *in vitro*, mais leurs propriétés pharmacocinétiques ne font pas d'eux des traceurs adéquats pour la neuroimagerie TEMP, ni chez le rat de type sauvage, ni chez le rat déficient en transporteur MDR1a. Le traceur du transporteur à la sérotonine : ¹²³I-ADAM, a au contraire des propriétés favorables à l'imagerie TEMP, et ce, même chez les rats de type sauvage ayant une barrière hémato-encéphalique pleinement fonctionnelle. La pénétration cérébrale du ¹²³I-R91150 quant à elle est considérablement augmentée chez les rats mutants par rapport aux animaux de type sauvage, l'utilisation de cette souche d'animaux est de ce fait une option intéressante pour l'imagerie TEMP des récepteurs 5-HT_{2A} chez le rat.

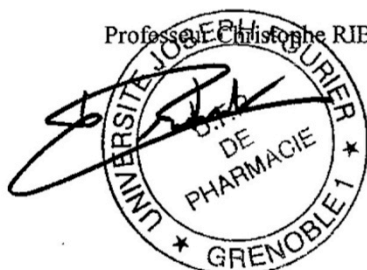
Le développement de méthodes d'imagerie *in vivo* des récepteurs sérotoninergiques chez le petit animal est d'un intérêt potentiel pour l'étude de modèles de pathologie neuropsychiatrique. Dans l'idéal, pour qu'un radioligand puisse être un traceur efficace d'un neurorécepteur, il doit présenter un certain nombre de propriétés pharmacocinétiques dont les principales sont les suivantes : il doit atteindre sa cible en quantité suffisante et s'y lier un temps suffisant pour être détecté, il ne doit pas se lier à d'autres cibles, ni engendrer de métabolites gênants par leur capacité à pénétrer dans le cerveau ou à se lier eux aussi à la cible biologique. La rigueur des exigences posées sur la pharmacocinétique des traceurs pour la réussite de la quantification *in vivo* de récepteurs en neuroimagerie TEMP chez les petits animaux, fait des rares traceurs efficaces des outils précieux.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER

Grenoble, le 16/7/2013

LE DOYEN

Professeur Christophe RIBUOT



LE PRESIDENT DE LA THESE

Professeur Emmanuel DROUET
Dr Emmanuel B. DROUET
Professeur

Université Joseph Fourier, Grenoble I France
Unit of Virus Host Cell Interactions
UVHCI, UMR 5283 UJF-EMBL-CNRS
Enseignement : Microbiologie et Immunologie
Faculté de Pharmacie
Domaine de la Merzi - 38700 La Tronche

Références

- Abbott, N. J., L. Ronnback, et al. (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.
- Akhtar, N., A. Ahad, et al. (2011). "The emerging role of P-glycoprotein inhibitors in drug delivery: a patent review." Expert Opin Ther Pat **21**(4): 561-576.
- Apostolova, I., A. Wunder, et al. (2012). "Brain perfusion SPECT in the mouse: normal pattern according to gender and age." Neuroimage **63**(4): 1807-1817.
- Baeken, C., R. De Raedt, et al. (2012). "Is treatment-resistance in unipolar melancholic depression characterized by decreased serotonin(2)A receptors in the dorsal prefrontal - anterior cingulate cortex?" Neuropharmacology **62**(1): 340-346.
- Blanckaert, P., I. Burvenich, et al. (2009). "Effect of cyclosporin A administration on the biodistribution and multipinhole muSPECT imaging of [123I]R91150 in rodent brain." Eur J Nucl Med Mol Imaging **36**(3): 446-453.
- Branderhorst, W., B. Vastenhouw, et al. (2010). "Pixel-based subsets for rapid multi-pinhole SPECT reconstruction." Phys Med Biol **55**(7): 2023-2034.
- Busatto, G. F., L. S. Pilowsky, et al. (1997). "Initial evaluation of 123I-5-I-R91150, a selective 5-HT_{2A} ligand for single-photon emission tomography, in healthy human subjects." Eur J Nucl Med **24**(2): 119-124.
- Catafau, A. M., M. Danus, et al. (2006). "Characterization of the SPECT 5-HT_{2A} receptor ligand 123I-R91150 in healthy volunteers: Part 1--pseudoequilibrium interval and quantification methods." J Nucl Med **47**(6): 919-928.
- Charnay, Y. and L. Leger (2010). "Brain serotonergic circuitries." Dialogues Clin Neurosci **12**(4): 471-487.
- Choi, S. R., C. Hou, et al. (2000). "Selective in vitro and in vivo binding of [(125)I]ADAM to serotonin transporters in rat brain." Synapse **38**(4): 403-412.
- Clark, C. T., H. Weissbach, et al. (1954). "5-Hydroxytryptophan decarboxylase: preparation and properties." J Biol Chem **210**(1): 139-148.
- Dahlstrom, A. and K. Fuxe (1964). "Localization of monoamines in the lower brain stem." Experientia **20**(7): 398-399.

- De Bruyne, S., L. Wyffels, et al. (2010). "In vivo evaluation of [123I]-4-(2-(bis(4-fluorophenyl)methoxy)ethyl)-1-(4-iodobenzyl)piperidine, an iodinated SPECT tracer for imaging the P-gp transporter." Nucl Med Biol **37**(4): 469-477.
- Donaldson, Z. R., K. M. Nautiyal, et al. (2013). "Genetic approaches for understanding the role of serotonin receptors in mood and behavior." Curr Opin Neurobiol.
- Ebdrup, B. H., H. Rasmussen, et al. (2011). "Serotonin 2A receptor antagonists for treatment of schizophrenia." Expert Opin Investig Drugs **20**(9): 1211-1223.
- Edwards, R. H. (2001). "Drug delivery via the blood-brain barrier." Nat Neurosci **4**(3): 221-222.
- Erspamer, V. and B. Asero (1952). "Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine." Nature **169**(4306): 800-801.
- Faraj, B. A., Z. L. Olkowski, et al. (1994). "Expression of a high-affinity serotonin transporter in human lymphocytes." Int J Immunopharmacol **16**(7): 561-567.
- Ho, P. S., K. K. Ho, et al. (2012). "Association study of serotonin transporter availability and SLC6A4 gene polymorphisms in patients with major depression." Psychiatry Res.
- Hoyer, D., D. E. Clarke, et al. (1994). "International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (Serotonin)." Pharmacol Rev **46**(2): 157-203.
- Innis, R. B., V. J. Cunningham, et al. (2007). "Consensus nomenclature for in vivo imaging of reversibly binding radioligands." J Cereb Blood Flow Metab **27**(9): 1533-1539.
- Jean, A., G. Conductier, et al. (2007). "Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(41): 16335-16340.
- Kamiie, J., S. Ohtsuki, et al. (2008). "Quantitative atlas of membrane transporter proteins: development and application of a highly sensitive simultaneous LC/MS/MS method combined with novel in-silico peptide selection criteria." Pharm Res **25**(6): 1469-1483.
- Kannan, P., C. John, et al. (2009). "Imaging the function of P-glycoprotein with radiotracers: pharmacokinetics and in vivo applications." Clin Pharmacol Ther **86**(4): 368-377.
- Kung, H. F., D. Frederick, et al. (1996). "In vivo SPECT imaging of 5-HT_{1A} receptors with [123I]p-MPPI in nonhuman primates." Synapse **24**(3): 273-281.
- Kung, M. P., D. Frederick, et al. (1995). "4-(2'-Methoxy-phenyl)-1-[2'-(n-2"-pyridinyl)-p-iodobenzamido]-ethyl- piperazine ([125I]p-MPPI) as a new selective radioligand of serotonin-1A sites in rat brain: in vitro binding and autoradiographic studies." J Pharmacol Exp Ther **272**(1): 429-437.

- Lammertsma, A. A. and S. P. Hume (1996). "Simplified reference tissue model for PET receptor studies." Neuroimage **4**(3 Pt 1): 153-158.
- Larsen, M. B., M. S. Sonders, et al. (2011). "Dopamine transport by the serotonin transporter: a mechanistically distinct mode of substrate translocation." J Neurosci **31**(17): 6605-6615.
- Liu, F., E. P. Lunsford, et al. (2012). "Real-time monitoring of tumorigenesis, dissemination, & drug response in a preclinical model of lymphangioleiomyomatosis/tuberous sclerosis complex." PLoS One **7**(6): e38589.
- Lopez-Gimenez, J. F., G. Mengod, et al. (1997). "Selective visualization of rat brain 5-HT_{2A} receptors by autoradiography with [3H]MDL 100,907." Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol **356**(4): 446-454.
- Lundgren, J. D., A. B. Newberg, et al. (2008). "123I-ADAM SPECT imaging of serotonin transporter binding in patients with night eating syndrome: a preliminary report." Psychiatry Res **162**(3): 214-220.
- Mairinger, S., T. Erker, et al. (2011). "PET and SPECT radiotracers to assess function and expression of ABC transporters in vivo." Curr Drug Metab **12**(8): 774-792.
- Marcinkiewicz, M., D. Verge, et al. (1984). "Autoradiographic evidence for the heterogeneity of 5-HT₁ sites in the rat brain." Brain Res **291**(1): 159-163.
- Marner, L., N. Gillings, et al. (2009). "Kinetic modeling of 11C-SB207145 binding to 5-HT₄ receptors in the human brain in vivo." J Nucl Med **50**(6): 900-908.
- Mc, I. W. and I. H. Page (1959). "The metabolism of serotonin (5-hydroxytryptamine)." J Biol Chem **234**(4): 858-864.
- Mohammad-Zadeh, L. F., L. Moses, et al. (2008). "Serotonin: a review." J Vet Pharmacol Ther **31**(3): 187-199.
- Moulin-Sallanon, M., Y. Charnay, et al. (2009). "Acute and chronic effects of citalopram on 5-HT_{1A} receptor-labeling by [18F]MPPF and -coupling to receptors-G proteins." Synapse **63**(2): 106-116.
- Muguruza, C., J. L. Moreno, et al. (2012). "Dysregulated 5-HT(2A) receptor binding in postmortem frontal cortex of schizophrenic subjects." Eur Neuropsychopharmacol.
- Muzi, M., D. A. Mankoff, et al. (2009). "Imaging of cyclosporine inhibition of P-glycoprotein activity using 11C-verapamil in the brain: studies of healthy humans." J Nucl Med **50**(8): 1267-1275.

- Nicastro, L. M., P.; Golaz, J.; Aubry, J.M.; Charnay, Y. (2012). "Au-delà des antidépresseurs sérotoninergiques... nouvelles stratégies pharmacologiques " Schweizer Archiv für Neurologie und Psychiatrie **163** (6).
- Nuyts, J., K. Vunckx, et al. (2009). "Small animal imaging with multi-pinhole SPECT." Methods **48**(2): 83-91.
- Ohtsuki, S. and T. Terasaki (2007). "Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development." Pharm Res **24**(9): 1745-1758.
- Passchier, J., A. van Waarde, et al. (2000). "Influence of P-glycoprotein on brain uptake of [18F]MPPF in rats." Eur J Pharmacol **407**(3): 273-280.
- Paterson, L. M., B. R. Kornum, et al. (2013). "5-HT radioligands for human brain imaging with PET and SPECT." Med Res Rev **33**(1): 54-111.
- Paxinos, G. (2004). The rat brain in stereotaxic coordinates / George Paxinos, Charles Watson. London :, Elsevier Academic.
- Peroutka, S. J. and T. A. Howell (1994). "The molecular evolution of G protein-coupled receptors: focus on 5-hydroxytryptamine receptors." Neuropharmacology **33**(3-4): 319-324.
- Peroutka, S. J. and S. H. Snyder (1979). "Multiple serotonin receptors: differential binding of [3H]5-hydroxytryptamine, [3H]lysergic acid diethylamide and [3H]spiroperidol." Mol Pharmacol **16**(3): 687-699.
- Pike, V. W., C. Halldin, et al. (2003). "Radioiodinated SB 207710 as a radioligand in vivo: imaging of brain 5-HT₄ receptors with SPET." Eur J Nucl Med Mol Imaging **30**(11): 1520-1528.
- Pullambhatla, M., J. Tessier, et al. (2012). "[¹²⁵I]FIAU imaging in a preclinical model of lung infection: quantification of bacterial load." Am J Nucl Med Mol Imaging **2**(3): 260-270.
- Rapport, M. M., A. A. Green, et al. (1948). "Serum vasoconstrictor, serotonin; isolation and characterization." J Biol Chem **176**(3): 1243-1251.
- Schiffer, W. K., M. M. Mirrione, et al. (2006). "Serial microPET measures of the metabolic reaction to a microdialysis probe implant." J Neurosci Methods **155**(2): 272-284.
- Schmitt, G. J., S. Dresel, et al. (2012). "Dual-isotope SPECT imaging of striatal dopamine: a comparative study between never-treated and haloperidol-treated first-episode schizophrenic patients." Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci **262**(3): 183-191.

- Seegers, U., H. Potschka, et al. (2002). "Expression of the multidrug transporter P-glycoprotein in brain capillary endothelial cells and brain parenchyma of amygdala-kindled rats." Epilepsia **43**(7): 675-684.
- Slifstein, M. and M. Laruelle (2001). "Models and methods for derivation of in vivo neuroreceptor parameters with PET and SPECT reversible radiotracers." Nucl Med Biol **28**(5): 595-608.
- Toh, C. C. (1954). "Release of 5-hydroxytryptamine (serotonin) from the dog's gastrointestinal tract." J Physiol **126**(2): 248-254.
- Twarog, B. M. and I. H. Page (1953). "Serotonin content of some mammalian tissues and urine and a method for its determination." Am J Physiol **175**(1): 157-161.
- Tyce, G. M. (1990). "Origin and metabolism of serotonin." J Cardiovasc Pharmacol **16 Suppl 3**: S1-7.
- Vilaro, M. T., R. Cortes, et al. (2005). "Serotonin 5-HT₄ receptors and their mRNAs in rat and guinea pig brain: distribution and effects of neurotoxic lesions." J Comp Neurol **484**(4): 418-439.
- Zhou, S. F. (2008). "Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition." Xenobiotica **38**(7-8): 802-832.



Serment des Apothécaires



Je jure, en présence des maîtres de la faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses. Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

LA TOMOGRAPHIE D'EMISSION MONOPHOTONIQUE CHEZ LE PETIT ANIMAL : APPLICATION A L'IMAGERIE DES RECEPTEURS SEROTONINERGIQUES CENTRAUX

Thèse soutenue le **16 septembre 2013** par **Noé Dumas**

noe.dumas@gmail.com

Résumé

L'avènement des scanners TEMP dédiés au petit animal de laboratoire offre des possibilités sans précédent pour l'étude non invasive de modèles animaux de maladies humaines. Cependant, l'application de cette technologie dans le domaine de la neuro-imagerie préclinique est limitée par la disponibilité de traceurs à la pharmacocinétique appropriée. Nous avons rapporté ici l'évaluation d'une sélection de traceurs sérotoninergiques d'intérêt potentiel pour l'imagerie TEMP du petit animal. Les récepteurs ciblés par ces traceurs (5-HT_{1A}, 5-HT_{2A}, 5-HT₄) et le transporteur de la sérotonine sont en effet traditionnellement impliqués dans des pathologies relevant de la neuropsychiatrie (troubles de l'humeur, schizophrénie et anorexie mentale). Les traceurs tels que le ¹²³I-SB207710 et le ¹²³I-p-MPPI sont des outils efficaces pour les études *ex vivo* ou *in vitro* des récepteurs 5-HT₄ et 5-HT_{1A} respectivement, mais leurs propriétés pharmacocinétiques n'en font pas des traceurs idéaux pour l'imagerie TEMP. Le traceur ¹²³I-ADAM a montré des résultats satisfaisants pour l'imagerie TEMP chez le rat, indépendamment de l'expression des transporteurs MDR1A, et son usage semble donc approprié pour étudier le transporteur de la sérotonine chez le rat. Le cas du ¹²³I-R91150 montre que les traceurs qui sont des substrats des transporteurs MDR1A pourraient bénéficier de l'utilisation d'animaux Mdr1a KO et voir une augmentation significative de leur pénétration cérébrale. Les animaux de souche Mdr1a KO représentent donc une option intéressante pour les études TEMP des récepteurs 5-HT_{2A} avec le traceur ¹²³I-R91150. Ce travail suggère également que le ¹²³I-R91150 pourrait être un outil utile à l'étude de l'activité des protéines MDR1A au niveau de la barrière hémato-encéphalique.

Mots clés : 5-HT, SPECT, MDR1A, P-gp